

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 27 日 (27.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/100548 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/06
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017125
- (22) 国際出願日: 2004 年 11 月 11 日 (11.11.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-101320 2004 年 3 月 30 日 (30.03.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 篠原 隆司 (SHINOHARA, Takashi) [JP/JP]; 〒6068351 京都府京都市左京区岡崎徳成町23-6 一浦マンション4-B号室 Kyoto (JP). 篠原 美都 (SHINOHARA, Mito) [JP/JP]; 〒6068351 京都府京都市左京区岡崎徳成町23-6 一浦マンション4-B号室 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING MULTIPOTENTIAL STEM CELL ORIGINATING IN TESTOID CELL

(54) 発明の名称: 精巣細胞由来多能性幹細胞の製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a process for producing multipotential stem cells characterized by comprising culturing testoid cells with the use of a medium containing glial-derived neurotrophic factor (GDNF) or its equivalent to thereby give multipotential stem cells. The above-described medium may further contain leukemia inhibitory factor (LIF), epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), etc. By using this process, multipotential stem cells, which can be obtained exclusively from a fertilized egg or an embryo by the existing methods, can be produced from an individual after birth. By using these multipotential stem cells, various tissues having favorable tissue compatibility for autotransplantation can be constructed, which makes them useful in medical fields including regeneration therapy and gene therapy. Moreover, these multipotential stem cells are usable in constructing a transgenic animal and a knockout animal, which makes them useful in the field of biotechnology.

(57) 要約: 本発明は、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得ることを含む、多能性幹細胞の製造方法を提供する。当該培地は更に白血病抑制因子 (LIF)、上皮細胞成長因子 (EGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) 等を含むことができる。本発明の製造方法を用いれば、従来受精卵や胚などからのみ得ることの出来た多能性幹細胞を、出生後の個体から製造することが可能である。当該多能性幹細胞を用いれば、自家移植のための組織適合性を有する多様な組織を構築することが可能であり、再生医療や遺伝子治療等の医学分野において有用である。また、当該多能性幹細胞はトランスジェニック動物やノックアウト動物等の作成に用いることが出来るので、バイオテクノロジー分野において有用である。

WO 2005/100548 A1

明細書

精巣細胞由来多能性幹細胞の製造方法

技術分野

- 5 本発明は、精巣細胞を用いて多能性幹細胞を製造する方法、当該方法により製造された多能性幹細胞、当該多能性幹細胞に由来するキメラ胚、キメラ動物、非ヒト動物等を製造する方法、当該多能性幹細胞から中胚葉系細胞等の機能細胞を製造する方法、精巣細胞に由来する多能性幹細胞の製造用組成物等に関する。

10

背景技術

- 生殖細胞(germ cell)は子孫へ遺伝子を伝播する能力を有する点でユニークである。この細胞は生殖のための配偶子を作るために高度に特殊化されているが、多くの証拠によりこの細胞の多能性が示唆されている。例えば、テラトーマ(teratoma)は、生殖腺にほとんど常に発生し、多様な成熟段階の多種の細胞や組織を含む。さらに、胎仔生殖細胞は特殊な条件下で培養した時に、多能性細胞を生ずることが知られている。これらの胚性生殖細胞(embryonic germ cell: EG細胞)は内部細胞塊(inner cell mass)から単離した胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)に類似した分化特性を有している。これらの知見は、生殖系列(germline lineage)細胞は多能性細胞を生み出す能力を維持していることを強く示唆するが、出生後の
- 15 正常生殖腺から多能性細胞が確立できたことはない。ES細胞及びEG細胞は、いずれも出生前の胚あるいは胎仔から採取されるので、ヒトへの臨床応用に際しては、倫理上の大きな問題を有しており、出生後の個体から多能性細胞を樹立する技術の開発が求められていた。

25

本願発明者らは、体内において子孫へ遺伝情報を伝えることのできる唯一の幹細胞である、精原幹細胞のインビトロ培養方法を開発した(Biol. Reprod., vol. 69, p612-616, 2003)。新生仔の精巣細胞をグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、白血病抑制因子(LIF)、上皮細胞成長因子(EGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)等の存在下で培養すると、生殖細胞が固有の形状のコロニーを形

成し、幹細胞が5ヶ月以上にわたり増殖した。不妊マウスの精細管に移植すると、培養した細胞は正常な精子及び子孫を産出し、テラトーマや体細胞への分化は認められないことから、生殖細胞系列に完全にコミットしていることが示された。これは精細管に移入するとテラトーマを生ずるES細胞とは対照的である。これらの結果に基づき、本願発明者らは、この細胞をES細胞やEG細胞と識別するために、生殖系列幹細胞 (germline stem cell: GS細胞) と名づけた。即ち、GS細胞は生殖系列細胞を拡大させる第3の方法の意義があるが、ES/EG細胞とは分化能力において明らかに異なっている。

上記事情に鑑み、本発明は、出生後の個体から多能性幹細胞を製造する新たな方法を提供することを目的とする。

発明の開示

上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、新生マウスの精巣細胞をGS細胞培養と類似の条件下で培養すると、GS細胞のコロニーに加えて、ES細胞コロニーと識別がつかない形態を呈するコロニーが出現することを確認した。これらのES様細胞はES細胞培養条件下で選択的に増殖した。当該ES様細胞はヌードマウスの皮下等に移植するとテラトーマを発生すること、インビトロで多様な機能細胞へと分化誘導されること、当該ES様細胞を胚盤胞 (blastocyst) 内にマイクロインジェクションすることにより正常な胚発生が起り、生殖細胞も含む極めて多様な組織を形成することなどから、当該ES様細胞は、ES細胞と同様に多能性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は以下に関する。

(1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得ることを含む、多能性幹細胞の製造方法。

(2) 培地が更に白血病抑制因子 (LIF) を含む、上記 (1) に記載の製造方法。

(3) 培地が更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれかを含む、上記 (1) 又は (2) のいずれか1つに記載の製造方法。

(4) 精巣細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、上記(1)～(3)のいずれか1つに記載の製造方法。

(5) 該精巣細胞は精原幹細胞である、上記(1)に記載の製造方法。

(6) 該精原幹細胞はG S細胞である、上記(5)に記載の製造方法。

5 (7) 該精巣細胞はP 5 3不全である、上記(1)に記載の製造方法。

(8) 以下の工程を含む、上記(1)に記載の製造方法：

(工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、培養細胞を得る工程；

10 (工程2) 白血病抑制因子(LIF)を含む培地を用いて、工程1で得られた培養細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程。

(9) 工程1の培地が更に白血病抑制因子(LIF)を含む、上記(8)に記載の製造方法。

15 (10) 工程1の培地が更に上皮細胞成長因子(EGF)及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)の少なくともいずれかを含む、上記(8)又は(9)のいずれか1つに記載の製造方法。

(11) 工程1が精巣細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、上記(8)～(10)のいずれか1つに記載の製造方法。

(12) 以下の工程を含む、上記(1)に記載の製造方法：

20 (工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、G S細胞を得る工程；

(工程2) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて、工程1で得られたG S細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程。

(13) 精巣細胞が哺乳動物由来である、上記(1)～(12)のいずれか1つに記載の製造方法。

25 (14) 哺乳動物が出生後である、上記(13)に記載の製造方法。

(15) 多能性幹細胞がSSEA-1、フォスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EpCAM、CD9、EE2及びc-kitからなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、上記(1)に記載の製造方法。

(16) 多能性幹細胞が SSEA-1、フォルスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EPCAM、CD9、EE2 及び c-kit が陽性である、上記 (15) に記載の製造方法。

5 (17) 上記 (1) ~ (16) のいずれか 1 つに記載の製造方法により製造された多能性幹細胞。

(18) SSEA-1、フォルスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EPCAM、CD9、EE2 及び c-kit からなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、精巢細胞に由来する多能性幹細胞。

10 (19) SSEA-1、フォルスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EPCAM、CD9、EE2 及び c-kit が陽性である、上記 (18) に記載の多能性幹細胞。

(20) 以下の工程を含む、キメラ胚の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

15 (工程 2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程。

(21) 以下の工程を含む、キメラ動物（ヒトを除く）の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程；

20 (工程 3) 当該キメラ胚を宿主動物の子宮又は卵管に移入し、キメラ動物（ヒトを除く）を得る工程。

(22) 以下の工程を含む、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

25 (工程 2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程；

(工程 3) 当該キメラ胚を宿主動物の子宮に移入し、キメラ動物（ヒトを除く）を得る工程；

(工程4) 当該キメラ動物を交配し、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物を得る工程。

(23) 以下の工程を含む、4倍体キメラ胚の製造方法：

5 (工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程2) 該多能性幹細胞を4倍体胚に導入し、4倍体キメラ胚を得る工程。

(24) 以下の工程を含む、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物の製造方法：

(工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

10 (工程2) 該多能性幹細胞を4倍体胚に導入し、4倍体キメラ胚を得る工程；

(工程3) 当該4倍体キメラ胚を宿主動物の子宮又は卵管に移入し、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物を得る工程。

(25) 以下の工程を含む、機能細胞の製造方法：

15 (工程1) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程2) 該多能性幹細胞を機能細胞分化条件にて培養し、機能細胞を得る工程。

(26) 該機能細胞は中胚葉系細胞である、上記(25)に記載の製造方法。

(27) 該中胚葉系細胞が、血球系細胞、脈管系細胞および心筋細胞からなる群から選ばれるいずれかである、上記(26)に記載の製造方法。

20 (28) 該機能細胞は外胚葉系細胞である、上記(25)に記載の製造方法。

(29) 該外胚葉系細胞は神経系細胞である、上記(28)に記載の製造方法。

(30) 神経系細胞が、神経細胞、グリア細胞、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトからなる群から選ばれるいずれかである、上記(29)に記載の方法。

(31) 該機能細胞は内胚葉系細胞である、上記(25)に記載の製造方法。

25 (32) グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)又はその均等物を含む、精巣細胞に由来する多能性幹細胞の製造用組成物。

(33) 更に白血病抑制因子(LIF)を含む、上記(32)に記載の組成物。

(34) 更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれかを含む、上記 (32) 又は (33) のいずれかに記載の組成物。

本発明の製造方法を用いれば、従来出生前の個体 (受精卵、胚等) からしか得ることの出来なかったES細胞やEG細胞等の多能性幹細胞を、出生後の個体から製造することが可能である。当該多能性幹細胞を用いれば、自家移植のための組織適合性を有する多様な組織を構築することが可能であり、再生医療、遺伝子治療等の医学分野において有用である。また、当該多能性幹細胞はトランスジェニック動物やノックアウト動物等の遺伝子改変動物の作成に用いることが出来るので、バイオテクノロジー分野において有用である。

図面の簡単な説明

図1はGS細胞および、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞のコロニーの形態を表す写真である。a～dの各図において、右下の線はいずれも50 μ mを示す。aは培養の初期段階においてGS細胞 (白矢頭) および当該多能性幹細胞 (白矢印) のコロニーが混在している状態を示す写真である。bは培養の初期段階における当該多能性幹細胞のコロニーの形態を示す写真である。多能性幹細胞同士がより詰め込まれている (packed)。cは完全に確立された当該多能性幹細胞のコロニーの形態を示す写真である。コロニーの形態が完全にES細胞コロニー様となっている。dは典型的なGS細胞のコロニーの形態を示す写真である。

図2は異なる染色体数を有する分裂中期スプレッド (metaphase spread) の分布を示す。少なくとも20個の細胞が計測された。ES細胞 (ES(129))、ddYマウス由来ES様細胞 (ES-like(ddY))、DBA/2マウス由来ES様細胞 (ES-like (DBA)) 及びDBA/2マウス由来GS細胞 (GS (DBA)) からの結果である。縦軸には頻度 (%) を、横軸には染色体数を示す。

図3は本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)は β 1-インテグリン、(c)は α 6-インテグリン、(d)はEpCAM、(e)はCD9、(f)はフ

オルスマン抗原、(g)はEE2、(h)はc-k i tの各発現を示す。縦軸には細胞数(個)を、横軸には各細胞表面マーカーの発現を相対的蛍光強度として示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合(ネガティブコントロール)のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合(%)は、それぞれ、(a) 85.14%、(b) 93.72%、(c) 97.98%、(d) 96.36%、(e) 99.11%、(f) 25.38%、(g) 92.29%、(h)は57.88%である。

図4はGS細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)は β 1-インテグリン、(c)は α 6-インテグリン、(d)はEpCAM、(e)はCD9、(f)はフォルスマン抗原、(g)はEE2、(h)はc-k i tの発現を示す。縦軸には細胞数(個)を、横軸には各細胞表面マーカーの発現を相対的蛍光強度として示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合(ネガティブコントロール)のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合(%)は、それぞれ、(a) 0.67%、(b) 84.83%、(c) 99.70%、(d) 99.20%、(e) 99.11%、(f) 1.72%、(g) 92.78%、(h)は64.14%である。

図5はES細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)は β 1-インテグリン、(c)は α 6-インテグリン、(d)はEpCAM、(e)はCD9、(f)はフォルスマン抗原、(g)はEE2、(h)はc-k i tの発現を示す。縦軸には細胞数(個)を、横軸には各細胞表面マーカーの発現を相対的蛍光強度として示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合(ネガティブコントロール)のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合(%)は、それぞれ、(a) 96.46%、(b) 99.69%、(c) 97.23%、(d) 96.10%、(e) 99.68%、(f) 79.11%、(g) 81.78%、(h)は93.90%である。

図6は培養開始前における精巣細胞の細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。(a)はSSEA-1、(b)はフォルスマン抗原の発現を示す。縦軸

には細胞数（個）を、横軸には相対的蛍光強度を示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合（ネガティブコントロール）のヒストグラムを、黒色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対するゲート中の細胞の割合（％）は、それぞれ、（a）0.92%、（b）43.02%である。

図7は培養開始前における精巣細胞の各細胞表面マーカーの発現を表すヒストグラムである。縦軸には細胞数（個）を、横軸には相対的蛍光強度を示す。白色カラムは一次抗体を用いずに細胞を染色した場合（ネガティブコントロール）のヒストグラムを、灰色カラムは一次抗体を用いて細胞を染色した場合のヒストグラムを示す。細胞数全体に対する陽性細胞の割合（％）を各ヒストグラム内に示す。

図8は抗E E 2抗体及び抗フォルスマン抗原抗体による新生精巣細胞の二重免疫染色の結果を示す図である。

図9はアルカリフォスファターゼ染色の結果を表す図である。（a）は本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞のコロニー、（b）はG S細胞のコロニー、（c）はE S細胞のコロニーをそれぞれ示す。

図10はR T－P C Rの解析結果を表す図である。G S細胞（G S）及び本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞（mG S）のO C T－4、R e x－1、N a n o g及びH P R Tの発現を示す。

図11はR T－P C Rの解析結果を表す図である。G S細胞（G S）、E S様細胞（E S－l i k e）及びE S細胞（E S）からのc D N Aの3倍希釈系列が特異的プライマーにより増幅された。

図12はE S様細胞におけるインプリンティングの解析結果を表す図である。H 1 9、M e g 3 I G、R a s g r f 1、I g f 2 r及びP e g 1 0領域のDMRメチル化を示す。DNAメチル化が亜硫酸染色体シーケンシングにより解析された。黒楕円はメチル化シトシンーグアニン部位（C p G s）を、白楕円は非メチル化C p G sを示す。

図13はE S様細胞におけるインプリンティングの解析結果を表す図である。

(A) P 5 3 ノックアウトマウスからのG S細胞及びE S様細胞のC O B R Aを示す。E S様細胞が見出された日を0日目とし、記載された時間にて細胞が採集された。この培養において、1 2日目までにはE S様細胞のみが見出された。図の下の数字はメチル化の割合(%)を示す。(B) 野生型マウス(Wild Type)及びP 5 3 ノックアウトマウス(P53)からのE S様細胞における、O c t - 4 遺伝子上流領域のC O B R Aを示す。図の下の数字はメチル化の割合(%)を示す。右図はO c t - 4 遺伝子上流領域の模式図である。白矢頭は非メチル化DNAの大きさを示す。黒矢頭はメチル化DNAの大きさを示す。各部位を切断するために用いられた酵素は括弧内に示す。U : 非切断、C : 切断。

- 10 図1 4はE S様細胞におけるインビトロ及びインビボでの分化を示す図である。
- (A-H) O P 9細胞での分化を示す図である。(A) 8日目における敷石状構造(血球系細胞)を示す図である。(B) 共培養7日後のC D 4 5陽性造血細胞の発生を示す図である(左)。該細胞群において、G r 1陽性顆粒球、M a c 1陽性マクロファージ又はT e r 1 1 9陽性赤血球が観察された(右)。(C) 採集された細胞のメイーギムザ染色を示す図である。ミエロイド前駆細胞(矢頭)と赤芽球(矢印)が観察された。(D、E) 脈管細胞(血管内皮細胞等)の分化を示す図である。F l k - 1陽性細胞は共培養4日後に選別され、C D 3 1陽性(D)又はV Eカドヘリン陽性(E)脈管細胞は細胞選別の6日後に出現した。(F-H) 心筋の分化を示す図である。F l k - 1陽性細胞は選別の6日後にM F 2 0陽性(F)又はc T n - I陽性(G)心筋に分化した。(H) A N P陽性(青)心房筋及びM L C 2 v陽性(茶)心室筋を示す図である。(I) 培養8日後にメチルセルロース内のエンブリオボディから発生した赤血球細胞を示す図である。細胞は赤色を示す。(J-M) ゼラチン被覆プレート上での神経細胞の分化を示す図である。誘導後5日目のT u j陽性ニューロン(J)、誘導後7日目のG F A P陽性アストロサイト(K)及びM B P陽性オリゴデンドロサイト(L)を示す。T u j陽性ニューロン(矢頭)の中に、T H及びT u j両陽性ドパミン作動性ニューロン(矢印)が出現した(M)。(N) 皮下のテラトーマ切片を示す図である。腫瘍は多様な分化細胞型を有し、筋(m)、神経(n)、そして上皮(e)組織を含む。(O-Q) P 5 3 ノックアウト
- 15
- 20
- 25

トGS細胞からの精子形成を示す図である。(O) 非移植(左)及び移植(右)レ
 ピシエント精巣の巨視的比較を示す図である。移植精巣はサイズの上昇を示す。(P、
 Q) 非移植(P)及び移植(Q)W精巣の組織学的様相を示す図である。精子形成
 において正常な様相を示す(Q)。染色: Cy 3、赤(J-M); Alexa F
 5 luor 488、緑(M)。スケールバー=50 μ m (A、D-I、J、K、M)、
 20 μ m (C、L)、200 μ m (N、P、Q)、1mm (O)。

図15はフローサイトメトリー解析の結果を表す図である。(a)はネガティ
 ブコントロール、(b)はTer119、(c)はCD45、(d)はMac1/
 Gr1 (Mixで染色)の解析結果を示す。(a)~(d)中、上側のドットプ
 10 ロットにおいて、縦軸には各細胞表面マーカーの発現を、横軸にはEGFPの発現
 を相対的蛍光強度としてそれぞれ示す。(a)~(d)中、下側の表は、各4分
 割ゲート(左上、右上、左下、右下)におけるプロット数(イベント)、全生存細
 胞数に対する割合(%ゲート)、全細胞数に対する割合(%全体)を示す。

図16はキメラ動物の作製を示す図である。(A) 12.5-dpcキメラ胚は、
 15 UV光下で蛍光発光を示す(矢印)。同腹のコントロール胚(矢頭)では、蛍光発
 光は観察されなかった。左図は可視光下での観察である。(B) 新生キメラ動物(矢
 印)は、蛍光発光を示した。(C) 成熟キメラ動物である。ドナー細胞由来の被毛
 色(黄褐色)を示す。(D-I) 12.5-dpcキメラ胚の側矢状断面を示す図
 である。蛍光発光は、脳(D)、腸管(E)、心臓(F)、肝臓(G)、脊髄(神
 20 経管)下部(H)及び胎盤(I)で観察された。(J) キメラマウス由来の精巣は、
 蛍光発光を示した。精巣細胞懸濁液中の生殖細胞の中に、EGFP発現が観察され
 た(挿入図)。(K) キメラ由来の子孫を示す図である。子孫の一個体(矢印)は
 蛍光発光を示し、ドナー由来であることが確認された。(L) ES様細胞を4倍体
 胚と凝集させて作製した10.5-dpc胚(矢印)と卵黄嚢は、蛍光発光を示し
 25 た。胎盤(矢頭)では蛍光は観察されなかった。対比染色はプロピジウムアイオダ
 イド(PI)で行った(D-I)。染色: EGFP、緑(A、B、D-L); PI、
 赤(D-I)。スケールバー=100 μ m (D-I)、1mm (J)。

図17はキメラマウス新生仔のUV光下での観察結果を示す。

図18はキメラマウス胎仔の凍結切片の蛍光顕微鏡による組織学的観察結果を示す図である（脊髄（神経管）下部）。

発明の詳細な説明

5 本発明の多能性幹細胞の製造方法は、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞（本明細書において、ES様細胞又は多能性生殖系列幹細胞（multipotent germline stem cells : mGS細胞）と呼ぶ場合がある）を得ること（例えば単離、分離、選別、精製等）を含む。

10 多能性幹細胞とは、インビトロにおいて培養可能で、長期間にわたって増殖することができ、自己複製能を持ち、生体を構成する全ての細胞やその前駆細胞に分化しうる能力を有する細胞をいう。

精巢細胞とは、精巢を構成する全ての細胞を含み、例えば、精原幹細胞、精原細胞、精細胞、精祖細胞、精母細胞、精娘細胞、精子、ライディヒ細胞、セルトリ細胞、間細胞、雄性生殖細胞、生殖細胞等が挙げられる。

精原幹細胞とは、自己再生し、精子又はその前駆細胞（例えば精原細胞、精細胞、精祖細胞、精母細胞、精娘細胞等）へ分化し得る能力（精原幹細胞としての能力）を有する生殖系列細胞をいう。精原幹細胞としては、例えば、始原生殖細胞（primordial germ cell）、雄性生殖細胞（gonocyte）、幹細胞である精原細胞（精原細胞のうち精原幹細胞としての能力を有する細胞）、生殖系列幹細胞（GS細胞）等が挙げられる。

GS細胞とは、インビトロでGDNFレセプター作動性化合物（GDNF又はその均等物）に依存的に増殖された精原幹細胞、例えば、Biol. Reprod., vol. 69, p612-616, 2003に記載された方法により増殖された精原幹細胞をいう。

精巢細胞は、精巢より自体公知の方法で調製することができる。例えば精巢を摘出し、摘出された精巢をコラゲナーゼ、トリプシン、DNaseなどの分解酵素で消化することにより、精巢細胞を分散させる（例えば、Biol. Reprod., vol. 69, p6

12-616, 2003 等を参照)。精巣細胞は培養液等により洗浄され、本発明の多能性幹細胞の製造に供せられる。

当該精巣細胞は、本発明の多能性幹細胞の製造に供せられる前に、培養されていてもよい。培養条件は、特に限定されないが、たとえば、Biol. Reprod., vol. 69, p612-616, 2003 に記載されているように、上述の酵素処理で得られた精巣細胞をグリリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、白血病抑制因子 (LIF) 等の存在下で培養させることにより、精原幹細胞を増殖させ、GS細胞を得て、これを用いてもよい。

また、当該精巣細胞は、本発明の多能性幹細胞の製造に供せられる前に、多能性幹細胞を産生する能力の高い画分を濃縮したものであってもよい。当該画分としては、例えば、精原幹細胞、精原細胞、雄性生殖細胞、生殖細胞等があり得る。

濃縮方法としては、例えば当該画分の細胞に特異的に発現する細胞表面抗原を認識する抗体を用いて、セルソーターや、抗体磁性マイクロビーズ等を用いる方法などが挙げられる。例えば、精原幹細胞は、 $\alpha 6$ -インテグリン、c-kit、CD 9 等の細胞表面抗原を指標に濃縮することができる (例えば、Proc Natl Acad Sci U SA, 97, 8346-8351, 2001; Biol. Reprod., vol. 70, p70-75, 2004 等を参照)。あるいはヘキスト等の dye を用いて精原幹細胞を濃縮することも可能である (Development, 131, 479-487, 2004 等を参照)。

本発明において用いられる精巣細胞は、動物由来であれば、特に限定されない。当該動物は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されず、脊椎動物、無脊椎動物のいずれであってもよいが好ましくは脊椎動物である。

脊椎動物としては、例えば、哺乳動物、鳥、魚、両生動物および爬虫類動物が挙げられる。哺乳動物としては、特に限られないが、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。鳥類としては、ニワトリ、ウズラ、アヒ

ル、ガチョウ、シチメンチョウ、オーストリッチ、エミュ、ダチョウ、ホロホロ鳥、ハト等を挙げることができる。

脊椎動物は、好ましくは哺乳動物である。

当該哺乳動物は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において、

- 5 出生前であつても、出生後であつてもよいが、好ましくは出生後である。

出生前の胎仔を用いる場合、該胎仔の発生段階は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されず、例えば雄性生殖堤 (genital ridge) の形成以降の発生段階が挙げられる。例えば、マウスにおいては、12.5 d p c より後、例えば13.0 d p c 以降、好ましくは13.5 d p c 以降、より好ましくは14.5 d p c 以降、更に好ましくは16.5 d p c 以降の発生段階を挙げることが出来る。

10

出生後の動物を用いる場合、該動物の齢は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されず、新生仔、幼仔、成体、老体のいずれであってもよいが、若齢の動物ほど精巣に含まれる幹細胞 (精原幹細胞等) の頻度が高いこと等から、製造効率の観点からはより若齢の動物を用いることが好ましい。即ち、用いられる動物は、好ましくは新生仔又は幼仔、より好ましくは新生仔である。ここで成体とは性成熟に達した個体 (例えばマウスでは4週以上の齢) を、幼仔とは性成熟には達していないが精子形成をしている個体 (例えばマウスでは5日～4週齢) を、新生仔とは精子形成が開始される以前の個体 (例えばマウスでは0～4日齢) をいう。

15

20

出生後の動物としてマウスを用いる場合、該マウスの齢は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、例えば0～8週齢、好ましくは0～3週齢、より好ましくは0～8日齢、最も好ましくは0～2日齢である。0日 (週) 齢とは、出生当日を意味する。

25

本発明において用いられる精巣細胞としてP53不全精巣細胞を用いてもよい。本発明の製造方法においてP53不全精巣細胞を用いることにより、野生型精巣細胞を用いた場合と比較して、極めて高い効率で多能性幹細胞を得ることが出来る場合がある。特に、精巣細胞として成体由来の細胞や、GS細胞を用いる場合等において、P

5 3 不全精巢細胞の利用は有利である。

「P 5 3 不全」とはP 5 3 遺伝子が機能的に不十分である状態、即ちP 5 3 遺伝子が本来有する正常な機能を十分に発揮できない状態をいい、P 5 3 遺伝子が全く発現していない状態、またはP 5 3 遺伝子が本来有する正常な機能が発揮できない程度に
5 その発現量が低下している状態、あるいはP 5 3 遺伝子産物の機能が完全に喪失した状態、またはP 5 3 遺伝子が本来有する正常な機能が発揮できない程度にP 5 3 遺伝子産物の機能が低下した状態が挙げられる。

P 5 3 不全精巢細胞としては、例えば、P 5 3 遺伝子欠損ホモ接合体又はP 5 3 遺伝子欠損ヘテロ接合体、好ましくはP 5 3 遺伝子欠損ホモ接合体を挙げることが出来る。
10 P 5 3 不全精巢細胞は、例えば、P 5 3 不全動物（P 5 3 遺伝子欠損動物等）の精巢細胞を回収することにより得ることが出来る。或いはP 5 3 遺伝子に対するターゲティングベクターを精巢細胞に導入し、相同性組換えによりP 5 3 遺伝子を欠損させることによって、P 5 3 不全精巢細胞を得ることが出来る。

また、別の実施態様では、P 5 3 不全精巢細胞は、P 5 3 遺伝子の発現または機能を抑制する物質（例えば、アンチセンス核酸、RNA i 誘導性核酸（s i RNA、s t RNA、m i RNA等）等）の細胞への導入により製造することが出来る。P 5 3 の発現または機能を抑制する物質の精巢細胞への導入は、自体公知の方法により行うことができ、例えば、P 5 3 遺伝子の発現または機能を抑制する物質が核酸分子又はそれを含む発現ベクターである場合、リン酸カルシウム法、リポフェクション法／リ
20 ポソーム法、エレクトロポレーション法などが用いられ得る。

本発明において、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）の均等物とは、本発明の方法において用いられたときに多能性幹細胞の製造を達成し得る範囲において特に限定されないが、ノルトリン（Neurturin）、ペルセフィン（Persephin）、アルテミン（Artemin）等のGDNF様化合物、GDNFレセプター（群）または補助レ
25 セプター（群）に対してグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）およびGDNF様化合物と同様の作用を有する他の化合物（例えばGDNFレセプター（群）または補助レセプター（群）を特異的に認識する抗体、GDNFレセプター（群）または補助レセプター（群）に対する作動性化合物等）を含む概念である。このような

レセプター（群）または補助レセプター（群）には、それぞれR e t チロシンキナーゼおよびG D N Fファミリーレセプター $\alpha : s$ が含まれる。

G D N F様化合物とは、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）と類似の構造を有するか、あるいはそのレセプターまたは補助レセプターに対してグリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）のように作用する化合物、例えば本発明の方法において用いられたときに多能性幹細胞の製造を達成し得る化合物を意味する。G D N F様化合物としては、特に、ノルトリン、ペルセフィン、アルテミン等が挙げられる。

グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）およびG D N F様化合物は構造的に類似し、c R e tレセプターチロシンキナーゼは、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、ノルトリン、ペルセフィンおよびアルテミンの共通するシグナル伝達レセプターとして作用する。

「グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）のように作用する化合物」とは、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）のシグナルを伝達するレセプターまたはその補助レセプターに対し、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）と同様に作用する化合物を意味する。

「G D N Fレセプター」とは、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）またはG D N F様化合物の結合物質、すなわち、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）またはG D N F様化合物のシグナルを伝達可能な化合物を意味する。「G D N Fレセプター」としては、特に、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）またはG D N F様化合物のシグナル媒介性レセプターであるc R e tレセプターチロシンキナーゼが挙げられる。

「G D N F補助レセプター」とは、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）またはG D N F様化合物のシグナルを伝達しないが、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）またはG D N F様化合物のシグナルを伝達するレセプターを活性化するレセプターを意味する。このような化合物は、特に、そのメンバーがG D N Fファミリーレセプター $\alpha : s$ （G F R α ）と称されるレセプターである。これらはまた、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、ペルセフィン、アルテミンおよびノルトリンのシグナル伝達レセプター複合体（signaling receptor complex）と関係す

る。該ファミリーのレセプターとしては4メンバー (GFR α 1~4) (Jing, S., et al., Cell, 85, 9-10 (1996); Jing, S. Q., et al., J. Biol. Chem., 272, 33111-33117 (1997); Treanor, J. J., et al., Nature, 382, 80-83 (1996); Subianto, P., et al., Human Molecular Genetics, 6, 1267-1273 (1997))が既知である。これらは独立してシグナルを伝達することができるが、すべてがリガンド結合およびcRet活性化に不可欠である。

本発明の製造方法において、培地中に含まれるグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物の濃度は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、通常0.05 ng/ml~100 mg/ml、例えば0.5 ng/ml~100 μ g/ml、好ましくは0.5 ng/ml~10 μ g/ml、より好ましくは0.5 ng/ml~1 μ g/ml、更に好ましくは0.5~200 ng/ml、いっそうより好ましくは0.5~50 ng/ml、最も好ましくは2~20 ng/mlである。

本発明の製造方法において用いられる培地は、更に白血病阻害因子 (LIF) を含むことが好ましい。

本発明の製造方法において、白血病阻害因子 (LIF) が培地中に含まれる場合には、その濃度は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、通常10~10⁶ units/ml、例えば10~10⁵ units/ml、好ましくは10²~10⁴ units/ml、より好ましくは3×10²~5×10³ units/mlである。

本発明の製造方法において用いられる培地は、好ましくは更に上皮細胞成長因子 (EGF) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の少なくともいずれか、より好ましくは両方を含む。

本発明の製造方法において、上皮細胞成長因子 (EGF) が培地中に含まれる場合には、その濃度は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、通常濃度0.05 ng/ml~100 mg/ml、例えば0.5 ng/ml~100 μ g/ml、好ましくは0.5 ng/ml~10 μ g/ml、より好ましくは0.5 ng/ml~1 μ g/ml、更に好ましくは0.5~200

ng/ml、いっそうより好ましくは0.5~50 ng/ml、最も好ましくは2~30 ng/mlである。

本発明の製造方法において、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) が培地中に含まれる場合には、その濃度は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、通常濃度0.05 ng/ml~100 mg/ml、例えば0.5 ng/ml~100 µg/ml、好ましくは0.5 ng/ml~10 µg/ml、より好ましくは0.5 ng/ml~1 µg/ml、更に好ましくは0.5~200 ng/ml、いっそうより好ましくは0.5~50 ng/ml、最も好ましくは2~20 ng/mlである。

10 本発明において培地に含まれうるサイトカイン(グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、白血病抑制因子(LIF)、上皮細胞成長因子(EGF)及び塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)等)は、動物由来のもの、好ましくは上述の哺乳動物由来のものであれば、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されない。

15 グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)としては、例えば、ヒト及びラット(WO 93/06116号パンフレット)、マウス(例えばGene 203, 2, 149-157, 1997 参照)等のグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)が例示される。

白血病阻害因子(LIF)としては、例えば、ヒト(特開平1-502985号公報)、マウス(特開平1-502985号公報)、ヒツジ(特開平4-502554号公報)、ブタ(特
20 開平4-502554号公報)、ウシ(特開平8-154681号公報)等の白血病阻害因子(LIF)が例示される。

上皮細胞成長因子(EGF)としては、例えば、マウス(例えばNature, 257, 325-327, 1975 参照)、ヒト(例えばProc Natl Acad Sci USA, 88, 415, 1991 参照)等の上皮細胞成長因子(EGF)が例示される。

25 塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)としては、例えば、ヒトbFGF(例えばEndocrine Rev., 8, 95, 1987 参照)、ウシbFGF(例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6963, 1984 参照)、マウスbFGF(例えばDev. Biol., 138, 454-

463, 1990 参照)、ラット bFGF (例えば Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 256-263, 1988 参照) 等が例示される。

また、当該サイトカインは、本発明の多能性幹細胞の製造方法において用いられた際に、当該多能性幹細胞の獲得を達成し得る範囲において、精製された天然、合成または組換えタンパク質、変異体タンパク質 (挿入、置換および欠失変異体を含む)、フラグメント、および化学修飾されたそれらの誘導体を含む。また、上述の各サイトカインの野生型のアミノ酸配列と実質的に相同なタンパク質も含む。

変異タンパク質における挿入、置換又は欠失されるアミノ酸の数は通常 1 ~ 20 個、好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 5 個、最も好ましくは 1 又は 2 個である。

「実質的に相同」とは、野生型のアミノ酸配列に対する相同性の程度が、好ましくは、70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、最も好ましくは 95%以上であることを意味する。相同性の割合 (%) は、(Atlas of Protein Sequence and Structure v.5, p.124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C. (1972)) に記載されているとおり、配列の整列を助するために 100 アミノ酸長中に 4 個のギャップを導入しうる場合には、比較する配列中の同一のアミノ酸残基であって整列する 2 種の配列の小さい方に存在するアミノ酸残基の割合 (%) として算出される。また、野生型のアミノ酸配列を有する上記各サイトカインに対する抗体との交差反応性に基づいて単離しうる任意のタンパク質、あるいは上記各サイトカインの野生型のアミノ酸配列をコードする遺伝子または遺伝子セグメントとのストリンジェントな条件下におけるハイブリダイゼーションにより単離される遺伝子によりコードされるタンパク質が、実質的に相同なものとして含まれる。

上記ストリンジェントな条件としては、例えばサムブルックら (Sambrook, J.) の「大腸菌におけるクローン遺伝子の発現 (Expression of cloned genes in E. coli) (Molecular Cloning: A laboratory manual (1989)) Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, USA, 9. 47-9. 62 及び 11. 45-11. 61」等に記載されたハ

イブリダイゼーション条件（例えば、約45℃、6.0×SSC中におけるハイブリダイゼーション等）が例示される。

多能性幹細胞等の幹細胞の培養においては、LIF、EGF、bFGF等のサイトカインを含む培地を用いることにより、より安定した幹細胞の培養が達成できる。

- 5 それゆえ、本発明の製造方法において、LIF、EGF、bFGF等を含む培地を用いることにより、より安定して多能性幹細胞を製造することができる。

LIFは例えば多能性幹細胞の未分化状態の維持に、EGF及びbFGFは例えば多能性幹細胞の増殖の増強に、それぞれ有用であり得る。

- 本発明の製造方法において用いられる培地の基礎培地は、自体公知のものを用いることができ、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、例えばDMEM、EMEM、RPMI-1640、 α -MEM、F-12、F-10、M-199、HAM、ATCC-CRCM30、DM-160、DM-201、BME、SFM-101、Fischer、McCoy's 5A、Leibovitz's L-15、RITC80-7、HF-C1、MCD107、NCTC135、Weymouth's MB752/1、StemPro-34 SFM等が挙げられる。また、ES細胞培養用等に改変された培地を用いてもよく、上記基礎培地の混合物を用いてもよい。

- 当該培地は、自体公知の添加物を含むことができる。添加物としては、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、例えば成長因子（例えばインスリン等）、鉄源（例えばトランスフェリン等）、ポリアミン類（例えばプトレシン等）、ミネラル（例えばセレン酸ナトリウム等）、糖類（例えばグルコース等）、有機酸（例えばピルビン酸、乳酸等）、血清蛋白質（例えばアルブミン等）、アミノ酸（例えばL-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール等）、ビタミン類（例えばアスコルビン酸、d-ビオチン等）、ステロイド（例えば β -エストラジオール、プロゲステロン等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）、緩衝剤（例えばHEPES等）、栄養添加物（例えばStemPro-Nutrient Supplement等）等が挙げられる。当該添加物は、それぞれ自体公知の濃度範囲内で含まれることが好ましい。

また、当該培地は、血清を含むことができる。血清としては、動物由来の血清であれば、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、好ましくは上記哺乳動物由来の血清（例えばウシ胎仔血清、ヒト血清等）である。また血清の代替添加物（例えば Knockout Serum Replacement (KSR) (Invitrogen 社製) 等）を用いてもよい。血清の濃度は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、通常、0.1～30 (v/v) % の範囲である。

本発明の製造方法においては、精巢細胞をフィーダー細胞の存在下で培養してもよい。フィーダー細胞としては、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、ES細胞やEG細胞等の多能性幹細胞を多能性を維持しながら培養する際に用いられる自体公知のフィーダー細胞を用いることができ、例えば、繊維芽細胞（マウス胎仔繊維芽細胞、マウス繊維芽細胞株 STO 等）が挙げられる。

フィーダー細胞は自体公知の方法、例えば放射線（ガンマ線等）照射や抗癌剤（マイトマイシンC等）処理等で不活化されていることが好ましい。

本発明の製造方法における細胞培養条件は、細胞培養技術において通常用いられている培養条件を用いることができる。例えば、培養温度は通常約30～40℃の範囲であり、好ましくは約37℃が例示される。CO₂濃度は通常約1～10%の範囲であり、好ましくは約5%が例示される。湿度は通常約70～100%の範囲であり、好ましくは約95～100%が例示される。

本発明の多能性幹細胞の製造方法を、更に詳細に説明すると、例えば以下の通りである。

精巢より分離された精巢細胞を、培地中に懸濁し、細胞培養用容器内に播種し、培養する（第一の培養）。

当該細胞培養用容器は、通常の細胞培養において使用されるものを用いることができるが、好ましくは、精巢細胞の容器への接着を促進させるために、ゼラチン等によってコーティングされている。以下の培養に用いられる容器も同様である。

第一の培養を継続することのみによっても、多能性幹細胞を製造することは可能であるが、好ましくは、第一の培養の開始から約6～18時間後（例えば一晚培養後）に、第一の培養における培養細胞、好ましくは浮遊している培養細胞（少なからず生殖細胞を含む）を、別の細胞培養用容器へ継代する（第二の培養）。継代された細胞は、培養条件によっても異なるが、継代後通常1週間以内に、細胞培養用容器の底面にコロニーを形成する。コロニー形成は顕微鏡等を用いて確認することができる。

好ましくは、第二の培養の開始から通常5～14日後、細胞をトリプシン処理等により分散し、培地中に再度懸濁して、更に新しい培養用プレートへ継代する（第3の培養）。同様に継代を繰り返すことで、平坦な形状の体細胞は消滅する。従って、2度目あるいは3度目の継代以降は、細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することが好ましい。継代の間隔、細胞の希釈率は、培養条件によって適宜判断されるが、例えば2～5日間隔、1～1/4希釈（培養初期においては好ましくは1～1/2希釈）が例示される。また、確立されたES細胞様コロニーの継代の間隔、細胞の希釈率としては、例えば2～5日間隔、1/4～1/10希釈が例示される。

上記培養において、培養された細胞は培養開始後約3～6週間までには、2種類の形態のコロニーを形成する。一方のコロニーは、細胞間架橋(intercellular bridge)と桑実胚(morula)様構造により特徴付けられる形態を有しており、これはGS細胞のコロニーである。他方のコロニーは、より硬く詰め込まれ(packed)、ES細胞のコロニーの形態と極めて類似した形態を有しており、これは本発明に係る多能性幹細胞のコロニーである。従って、GS細胞のコロニーと、本発明にかかる多能性幹細胞のコロニーとは、明確に視覚的に識別することができる。

上述の形態を指標に、例えば、顕微鏡下で多能性幹細胞のコロニーをパスツールピペット、マイクロマニピュレーター等を用いて選択的にピックアップするか、限界希釈等により、多能性幹細胞を単離し得る。あるいは多能性幹細胞の細胞表面マーカー等を指標にして、セルソーター等を用いて多能性幹細胞を単離し得る。

また、一態様において、上述と同様の培養条件により、GDNF又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養することによりGS細胞を得て、該GS細胞を更に

上述の培養条件により GDNF 又はその均等物を含む培地を用いて引続き培養することによっても、GS 細胞から多能性幹細胞が派生し、本発明の多能性幹細胞を得ることが出来る。

- 5 GS 細胞のコロニーの形態は、上述の通り、本発明に係る多能性幹細胞のコロニーと、明確に視覚的に識別可能であり、顕微鏡下で GS 細胞のコロニーをパスツールピペット、マイクロマニピュレーション等を用いて選択的にピックアップするか、限界希釈等により、GS 細胞を単離し得る。

- この場合、GS 細胞を獲得するための培養期間は、本発明の方法により多能性幹細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、該培養期間は通常 1 年以内、例えば 6 ヶ月以内、好ましくは 3 ヶ月以内、より好ましくは 7 週間以内である。

本発明の多能性幹細胞の製造方法においては、工程全体を通して、同一組成の培地を用いてもよいが、複数の組成の培地を、経時的に使い分けて用いてもよい。このようにすることで多能性幹細胞をより選択的に増殖させ、多能性幹細胞をより効率よく製造することができる場合がある。

- 15 例えば、培養に用いる培地を、培養の途中で、精巢細胞の初期の培養に用いる培地（培地 A とする）から、多能性幹細胞の長期培養により適した培地（培地 B とする）へ変換することができる。

即ち、培地 A を用いて精巢細胞を培養し、培養細胞を得て、当該培養細胞を培地 B を用いて培養することで、多能性幹細胞を効率よく得ることができる。

- 20 培地 A に含まれ得るサイトカインは、上述と同様である。

培地 B は上述のサイトカイン（グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物、白血病抑制因子（LIF）、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF））を含まなくてもよいが、好ましくは白血病抑制因子（LIF）を上述と同様の濃度で含む。

- 25 また、培地 A、B にそれぞれ含まれ得る血清の濃度は、上述と同様であるが、培地 A 中に含まれ得る血清の濃度は、好ましくは 0.1～5（v/v）% であり、より好ましくは 0.3～3（v/v）% である。培地 B 中に含まれ得る血清の濃度は、

好ましくは2～30 (v/v) %であり、より好ましくは10～20 (v/v) %である。

また、培地A、Bのそれぞれの基礎培地は、上述と同様であるが、培地Aの基礎培地は、精原幹細胞 (GS細胞等) の培養に好適に用いられる基礎培地 (例えばStemPro-34 SFM等) であり得、培地Bの基礎培地はES細胞の培養に好適に用いられる基礎培地 (例えばDMEM等) であり得る。

培地A、Bが含むことができる添加物は、上述と同様である。

培地を培地Aから培地Bに変換する時期は、培養条件等によって異なるため、一律に規定しがたいが、例えばマウスの場合、第一の培養の開始から10～120日後、好ましくは14～40日後である。

更に、培地Aを培地Bへ変換した直後の約4～40日間、培地Bにグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を上述の濃度で添加した組成の培地を用いて細胞を培養することにより、より高い効率で多能性幹細胞を製造し得る。

またこのような培地A、培地Bを用いる精巢細胞の培養は上述と同様にフィーダー細胞の存在下で行ってもよい。

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、通常2ヶ月以上、好ましくは5ヶ月以上にわたり、多能性を維持しながら増殖する。

単離された当該多能性幹細胞の維持、増殖、培養においては、好ましくは、上述の培地Bが用いられる。

本発明の製造方法により得られた細胞が多能性を保持しているか否かは、以下に例示する自体公知の方法により確認することができる。

例えば、フローサイトメーター等を用いて、得られた細胞の細胞表面マーカ等の発現が解析される。有用な細胞表面マーカーとしては、SSEA-1 (ES細胞マーカー)、フォルスマン抗原 (ES細胞マーカー)、 β 1-及び α 6-インテグリン (ES及びGS細胞マーカー)、EPCAM (ES細胞及び精原細胞 (spermatogonia) マーカー)、CD9 (ES細胞及び精原幹細胞マーカー)、EE2 (精原細胞マーカー)、c-kit (分化した精原細胞マーカー) 等が挙げられる。

本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、例えばマウス由来の多能性幹細胞であれば、SSEA-1、フォルスマン抗原、 $\beta 1$ -及び $\alpha 6$ -インテグリン、EPCAM、CD9、E2及びc-kitからなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性であり、好ましくは、全てが陽性である。また、フォルスマン抗原及びc-kitは好ましくは弱陽性である。GS細胞はSSEA-1及びフォルスマン抗原が陰性であるので、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞はGS細胞から明確に識別される。

ここで細胞表面マーカーの発現が「陽性」とは、細胞表面マーカーが細胞表面上に発現しており、当該細胞表面マーカーに対する特異的抗体による特異的結合が確認できることをいう。「弱陽性」とは、他の細胞と比較して、細胞表面マーカーの発現量が相対的に弱い、細胞表面マーカーの発現量の弱い集団が相対的に多い、又は細胞表面マーカーを発現している細胞集団の割合が相対的に少ないこと等をいう。

マウス以外の動物種の多能性幹細胞においても、細胞表面マーカーの発現様式はマウスと同様である。ただし、当該動物種が生来的に保有していないマーカーがある場合は、当該マーカーは解析から除外されるなど、種差が考慮される。

また、本発明の製造方法により得られた細胞の細胞内のアルカリフォスファターゼの活性を自他公知の方法により測定することによっても、当該細胞が多能性を保持しているか否かを確認することができる。本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、ES細胞と同様にアルカリフォスファターゼが陽性である。一方、GS細胞はアルカリフォスファターゼが弱陽性乃至陰性であるので、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、GS細胞から明確に識別される。

あるいは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)等によって、多能性幹細胞に特異的に発現している遺伝子等の発現を解析することによっても、本発明の製造方法により得られた細胞が多能性を保持しているか否かを確認することができる。例えばマウス由来の多能性幹細胞であれば、多能性幹細胞に特異的に発現している遺伝子としては、Oct-4、Rex-1、Nanog、Cripto、ERas、UTF1、ZFP57、Esg-1等の未分化なES細胞を維持するのに必須の分子が例示される。本発明の製造

方法により得られる多能性幹細胞は、Oct-4、Rex-1、Nanog、Cripto、Eras、UTF1、ZFP57及びEsrr1からなる群から選ばれる少なくともいずれかの遺伝子を発現しており、好ましくは、全ての遺伝子を発現している。GS細胞においては、これらの遺伝子の発現は本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞と比較して一般に弱く、特にNanogの発現がほとんど認められず、当該多能性幹細胞は、GS細胞から明確に識別される。

更に、染色体DNA中のDMRの亜硫酸塩染色体シーケンシング (Development, vol. 129, p1807-1817, 2002) やCOBRA (Nucl. Acid. Res., vol. 25, p2532-2534, 1997) 等により、細胞のインプリンティングパターンを解析することによっても、本発明の製造方法により得られた細胞が多能性を保持しているかを確認し、或いは他の幹細胞 (ES細胞、GS細胞等) と明確に識別することが出来る。例えば本発明の方法により得られた多能性幹細胞がマウス由来であれば、母性インプリント領域であるIgf2r及びPeg10のDMRはほとんどメチル化されていないが、ES細胞はよりメチル化されている (例えばメチル化頻度として2倍以上) 。また、父性インプリント領域であるH19及びMeg3IGのDMRは、GS細胞においてはほぼ完全にメチル化されているが、本発明の多能性幹細胞においてはそのメチル化は不完全である (例えばメチル化頻度として0~60%) 。

GS細胞のDMRはほぼ完全に雄性的インプリンティングパターンを有し得るので、本発明の方法を用いて精原幹細胞 (GS細胞等) から多能性幹細胞を製造する際に、該インプリンティングパターンを追跡することにより、培養物中の該多能性幹細胞の割合や、製造の進行の程度を把握することが出来る。即ち、GS細胞からの多能性幹細胞の派生に伴い、父性インプリント領域 (H19、Meg3IG、Rasgrf1等) におけるDMRのメチル化頻度は低下し得る。

また、Oct-4領域のDMRの低メチル化状態 (例えばメチル化頻度として20%以下の状態) を確認することにより、本発明の方法により製造された多能性幹細胞が未分化状態を維持していることを確認することも出来る。

本発明の製造方法により得られた細胞を、免疫不全動物や免疫寛容を誘導した動物の皮下又は精細管内等へ注入し、テラトーマの形成の有無を解析することによ

ても、当該細胞の多能性を確認できる。本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞はテラトーマを形成することができ、当該テラトーマ内には3つの胚葉系に分化した多様な細胞（例えば神経、表皮、筋肉、気管支上皮、軟骨、骨、扁平上皮、神経上皮等）が確認される。一方、G S細胞は精細管内へ注入されると、精子形成コロニーを形成し、テラトーマを形成しない。従って、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞はG S細胞と明確に識別される。

また、本発明の製造方法により得られた細胞を宿主胚に導入し、キメラ動物の誕生の有無を解析することによっても、当該細胞が多能性を保持しているか否かを確認することができる。本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、宿主胚に導入されると、キメラ動物の正常な発生に寄与することができる。一方、G S細胞は宿主胚に導入されても、キメラ動物の正常な発生に寄与することは出来ず、従って、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞はG S細胞と明確に識別される。

また、インビトロにおいてE S又はE G細胞を各種の機能細胞へ分化させる自体公知の方法を適用し、本発明の製造方法により得られた細胞のインビトロにおける分化能力を解析することによっても、当該細胞の多能性を確認できる。「機能細胞」とは、E S又はE G細胞から派生し得る体細胞又は生殖細胞であり、例えば、外胚葉系細胞、中胚葉系細胞、内胚葉系細胞等を挙げることが出来る。

例えば、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、自体公知の中胚葉系細胞分化条件にて培養することにより、中胚葉系細胞へ分化する。

中胚葉系細胞としては、特に限定されないが、例えば、血球系細胞（造血系細胞を含む）、脈管系細胞（血管内皮細胞等）、心筋細胞（例えば心房筋細胞、心室筋細胞等）、骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞等が挙げられる。好ましくは、中胚葉系細胞は、血球系細胞、脈管系細胞（血管内皮細胞等）又は心筋細胞である。

上記血球系細胞としては、特に限定されないが、例えば血球細胞（例えばCD 4 5陽性細胞など）、赤芽球系細胞（例えばTer 119陽性細胞など）、ミエロイド系細胞（例えば単球系細胞（例えばMAC 1陽性細胞など）、好中球系細胞（例えばGr 1陽性細胞など））などが挙げられる。

上記心筋細胞としては、例えばMF 20陽性細胞等、c T n - I 陽性細胞などが、心房筋細胞としてはANP陽性細胞等、心室筋としてはMLC 2 v 陽性細胞等、上記脈管系細胞（血管内皮細胞等）としては、例えばCD 31 陽性細胞、VEカドヘリン陽性細胞などが挙げられる。脈管系細胞はD i I アセチル化低密度リポタンパク質の取込によっても特定され得る。

中胚葉系細胞分化条件としては、ES又はEG細胞を中胚葉系細胞へ分化させ得る、自体公知の条件が挙げられ、特に限定されないが、例えばタイプIVコラーゲンコートしたプレート中における培養（例えばBlood, vol. 93, p1253-1263, 1999等参照）、メチルセルロース培地中での培養（Development, vol 125, p1747-1757, 1998）、中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞（例えばOP 9細胞などのストローマ細胞）との共培養（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 100, p4018-4023, 2003; Exp. Hematol., vol. 22, p979-984; Science, vol. 272, 722-724, 1996; Blood, vol. 93, p1253-1263, 1999; Development, vol 125, p1747-1757, 1998等参照）などが挙げられる。

本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞を血球系細胞や脈管系細胞（血管内皮細胞等）へ分化させる場合には、好適には、当該多能性幹細胞を上述の中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養する（例えば「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 100, p4018-4023, 2003」、「Exp. Hematol., vol. 22, p979-984」、「Science, vol. 272, 722-724, 1996」等参照）。例えばマウスの場合には、当該多能性幹細胞を上述の中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養することにより、脈管-造血前駆細胞への分化を誘導し、該細胞を例えばPECAM-1陽性細胞、Flk-1陽性細胞として採取し、得られた細胞を更に中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養することにより、脈管細胞を得ることが出来る。或いは、該細胞はメチルセルロース培地中で培養されてもよい（Development, vol 125, p1747-1757, 1998）。

また、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞を心筋細胞へ分化させる場合には、好適には、当該多能性幹細胞をSCFの存在下で上述の中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養する（例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 10

0, p4018-4023, 2003 等参照)。或いは、例えばマウスの場合には、当該多能性幹細胞を上述の中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養することにより、F1k-1陽性細胞を採取し、得られた細胞を更に中胚葉系細胞分化誘導用フィーダー細胞と共培養することにより、心筋細胞を得ることが出来る。

- 5 また、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、自体公知の外胚葉系細胞分化条件にて培養することにより、外胚葉系細胞へ分化する。外胚葉系細胞としては、特に限定されないが、例えば、神経系細胞、表皮系細胞等が挙げられる。外胚葉系細胞分化条件としては、ES又はEG細胞を外胚葉系細胞へ分化させ得る自体公知の条件が挙げられ、特に限定されないが、例えば、下記の神経系細胞分化誘導条件等が挙げられる。
- 10

本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、自体公知の神経系細胞分化条件にて培養することにより、神経系細胞へ分化する。神経系細胞としては、例えば神経細胞（例えばMAP2陽性細胞、Tuj陽性細胞など）、ドパミン作動性ニューロン（例えばTH及びTuj両陽性細胞など）、グリア細胞（例えばMBP陽性細胞など）、オリゴデンドロサイト（例えばMBP陽性細胞など）、アストロサイト（例えばGFAP陽性細胞等）等が挙げられる。

15

神経系細胞分化条件としては、ES又はEG細胞を神経系細胞へ分化させ得る自体公知の条件が挙げられ、特に限定されないが、例えば、神経細胞分化誘導培地（例えばN2B27培地）を用いたゼラチンコートプレート上での培養等が挙げられる（例えばNature Biotechnology, vol.21, 183-186, 2003 等参照）。

20

また、本発明の製造方法により得られる多能性幹細胞は、自体公知の内胚葉系細胞分化条件にて培養することにより、内胚葉系細胞へ分化する。内胚葉系細胞としては、特に限定されないが、例えば、消化器系細胞、膵細胞、肝細胞、呼吸器系細胞、甲状腺等が挙げられる。内胚葉系細胞分化条件としては、ES又はEG細胞を内胚葉系細胞へ分化させ得る自体公知の条件が挙げられ、特に限定されないが、例えば、インスリン産生細胞への分化条件（Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11307-11312）等が挙げられる。

25

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、半永久的に凍結保存することが可能であって、必要に応じて融解・起眠して使用することができる。当該多能性幹細胞は凍結保存・融解後も多能性を維持する。凍結保存においては、ジメチルスルホキシドとウシ胎仔血清アルブミンを含有するセルバンカー（DIA-IATRON 社製）等の自体公知の細胞凍結保存用組成物中に細胞を懸濁し、
5 等、 $-80 \sim -200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは -196°C （液体窒素中）の条件で細胞を保存する。

本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を凍結保存後起眠させる際には、常法に従って溶媒中で融解し、懸濁して細胞浮遊液とする。融解の方法も特に限定されないが、例えば、 37°C の恒温槽中で、10%胎仔ウシ血清を含有するDMEM
10 M（DMEM/FCS）を用いて行うことができる。具体的には、恒温槽に凍結チューブを浮かべ、凍結させた細胞へDMEM/FCSを滴下して融解する。細胞を遠心して洗浄した後、培地に再度懸濁する。

一度起眠した当該多能性幹細胞を、培養後、再度凍結しても、当該細胞の多能性は維持される。

15 本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、長期間にわたって、多能性を維持した状態で増殖することができるので、自体公知の方法で、当該多能性幹細胞の遺伝子を改変し、例えば、特定の外来遺伝子が導入された多能性幹細胞や、特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞等の遺伝子改変多能性幹細胞を製造することができる。

20 本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞への遺伝子導入の方法としては、例えば、特定の遺伝子が機能的に発現できるように構築されたベクターを多能性幹細胞に導入する。ベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等を用いることができる。また、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、センチウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクシニアウイルス等が挙げられる。
25

ベクターを多能性幹細胞に導入する方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等の一般的な遺伝子導入法が挙げられる。ウイルスをベクターに用いる場合には、上述

の一般的な遺伝子導入法によりウイルスのゲノムを細胞に導入してもよいし、ウイルス粒子を、細胞へ感染させることによっても、該ウイルスのゲノムを細胞に導入することができる。

特定の外来遺伝子が導入された安定な遺伝子改変多能性幹細胞を選択するには、

- 5 例えば、ベクターと同時にマーカー遺伝子を細胞へ導入し、マーカー遺伝子の性質に応じた方法で細胞を培養すればよい。例えば、マーカー遺伝子が、宿主細胞に致死活性を示す選抜薬剤に対する薬剤耐性を付与する遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、ベクターが導入された細胞を培養すれば良い。薬剤耐性付与遺伝子と選抜薬剤の組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子とネオマイシンとの組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子とハイグロマイシンとの組み合わせ、ブラストサイジンS耐性付与遺伝子とブラストサイジンSとの組み合わせなどをあげることができる。
- 10

特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞を得る方法としては、例えばターゲッティングベクターを用いた相同的組換え（ジーンターゲッティング法）が挙げられる。

- 15 即ち、特定の遺伝子の染色体DNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすること等によって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（ターゲッティングベクター）を、相同組換え法により多能性幹細胞の染色体に導入し、得られた細胞について当該特定の遺伝子のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザン
- 20
- 25 ハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した特定の遺伝子のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞を選択することにより得ることができる。或いは、組織特異的または発

達段階特異的な様式で特定の遺伝子を欠失させるCre-loxP系等を用いてもよい(Martha, J. D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K. U. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330)。

- 5 本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞は、生体を構成する全ての体細胞へ分化する能力を有しており、ES細胞やEG細胞に適用される全ての試験技術、方法を当該多能性幹細胞に適用することができ、当該多能性幹細胞を用いて多様な機能細胞、組織、動物(ヒトを除く)等を製造することができる。また上述の方法で遺伝子を改変した多能性幹細胞を用いれば、遺伝子が改変された多様な機能細胞、
- 10 組織、動物(ヒトを除く)等を製造することができる。

例えば、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を上述の中胚葉系細胞分化条件にて培養することにより、上述の中胚葉系細胞を製造することができる。

- また、本発明の製造方法により得られるマウスの多能性幹細胞を上述の外胚葉系細胞(例えば神経系細胞等)分化条件にて培養することにより、上述の外胚葉系細胞
- 15 細胞(例えば神経系細胞)を製造することができる。

更に、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を上述の内胚葉系細胞分化条件にて培養することにより、上述の内胚葉系細胞を製造することができる。

- その他、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を、例えば、ES細胞を脈管細胞(血管内皮細胞等)へ分化させる方法(Development, vol.125, 1747-1757, 1998)、ES細胞を神経細胞へ分化させる方法(Neuron, vol.28, 31-40, 2000)、
- 20 ES細胞を色素細胞へ分化させる方法(Development, vol.125, 2915-2923, 1998)、ES細胞をインスリン産生細胞へ分化させる方法(Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11307-11312, 2000)、ES細胞を外胚葉系細胞へ分化させる方法(WO 01/088100号パンフレット)、ES細胞の細胞塊(エンブリオイドボディ)を形成させることにより内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、血液細胞、内皮細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、グリア細胞、神経細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトを製造する方法(Reprod. Fertil. Dev., 10, 31, 1998)等を用いて、多様な機能細胞へと分化誘導することにより、多様な機能細胞を製造す
- 25

ることができる。或いは、Proc Natl Acad Sci USA, vol. 100, p11457-11462, 2003 や、Nature, vol. 427, p148-154, 2004 に記載された方法により、本発明の多能性幹細胞より精子等の生殖細胞を製造し、これを交配に用いることにより該多能性幹細胞の子孫動物を得ることも可能であり得る。

- 5 また、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞をヌードマウス等の免疫不全動物や、免疫寛容を誘導した動物に移入することによりテラトーマを形成させ、当該テラトーマ中から多様な機能細胞を単離することもできる。

更に、本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞の遺伝子を改変し、得られた遺伝子改変多能性幹細胞に上述の方法を適用することにより、遺伝子改変機能細胞
10 胞を得ることが可能である。

本発明に係る多能性幹細胞を用いた動物（ヒトを除く）の製造は、例えばキメラ胚を用いる方法等の自体公知の方法に準じて行うことができる。

- 例えば、まず本発明の製造方法により得られた多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る。「宿主」の動物種は、導入される多能性幹細胞の動物種と同一であることが好ましい。「胚」としては、特に限定されないが、例えば胚盤胞、8細胞期胚等が挙げられる。
15 あることが好ましい。「胚」としては、特に限定されないが、例えば胚盤胞、8細胞期胚等が挙げられる。

- 「胚」はホルモン剤（例えば、F S H様作用を有するP M S GおよびL H作用を有するh C Gを使用）等により過排卵処理を施した雌動物を、雄動物と交配させることに等より得ることができる。多能性幹細胞を宿主胚に導入する方法としては、
20 マイクロインジュクション法や凝集法等が知られているが、いずれの方法を用いることも可能である。

- 次に、当該キメラ胚を宿主動物の子宮又は卵管に移入し、キメラ動物（ヒトを除く）を得る。宿主動物は好ましくは偽妊娠動物である。偽妊娠動物は、正常性周期の雌動物を、精管結紮などにより去勢した雄動物と交配することにより得ることができる。キメラ胚が移入された宿主動物は、妊娠し、キメラ動物（ヒトを除く）を出産する。
25 出産する。

更に、当該キメラ動物（ヒトを除く）を正常動物又は当該キメラ動物同士と交配し、次世代（F 1）個体の中から当該多能性幹細胞由来遺伝子を保有する個体を選

択することにより、当該多能性幹細胞由来遺伝子を保有する動物（ヒトを除く）（当該多能性幹細胞に由来する動物）を得ることができる。多能性幹細胞由来遺伝子を保有する動物（ヒトを除く）の選択は、様々な形質を指標として用いることができるが、例えば体色や被毛色が指標として用いられる。また、体の一部からDNAを抽出し、サザンブロット解析やPCRアッセイを行うことにより、選択を行うこともまた可能である。

また、本発明に係る多能性幹細胞を4倍体胚に導入し、4倍体キメラ胚を得て、当該4倍体キメラ胚を宿主動物の子宮又は卵管に移入することによって、該多能性幹細胞に由来する動物を直接得ることも出来る（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p8424-8428, 1993）。4倍体胚は自体公知の方法により胚盤胞を電気融合させることにより得ることが出来るが、2細胞胚盤胞をマンニトール溶液中で電気パルスを適用することによって電気融合させてもよい。

上述の方法を用いることにより、例えば特定の外来遺伝子が導入された多能性幹細胞から、当該導入された外来遺伝子を保有する動物（トランスジェニック動物）を得ることができる。また、特定の遺伝子を欠損した多能性幹細胞から、遺伝子欠損ヘテロ接合体動物を得ることができる。更に得られた遺伝子欠損ヘテロ接合体動物を繁殖させることで、遺伝子欠損ホモ接合体動物を得ることができる。

また、本発明は、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物を含む、精巣細胞に由来する多能性幹細胞の製造用組成物に関する。当該組成物を含む培地を用いて、上述の方法により精巣細胞を培養することにより、精巣細胞に由来する多能性幹細胞を得ることができる。

当該組成物は、更に白血病抑制因子（LIF）を含むことが出来る。

また、当該組成物は、更に上皮細胞成長因子（EGF）及び塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）の少なくともいずれか、好ましくは全てを含むことができる。

当該組成物は、更に生理学的に許容される担体、賦形剤、防腐剤、安定剤、結合剤、溶解補助剤、非イオン性界面活性剤、緩衝剤、保存剤、酸化防止剤、上述の添加物、基礎培地などを含むことができる。

当該組成物は、等張な水溶液、あるいは粉末等の状態で、本発明の製造方法に用いる培地に添加されるなどして用いられる。あるいは当該組成物は、本発明の製造方法に用いられる培地であってもよい。

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

実験材料及び方法

(細胞培養)

10 精巣細胞は、d d Yマウス、DBA/2マウス、あるいはDBA/2バックグラウンドにかけあわせたトランスジェニックマウス系統C57BL6/Tg14(act-EGFP-Osby01) (以下 Green mice と呼ぶことがある) (大阪大学、岡部博士より提供) の新生仔 (生後0～8日齢) から採集された。この Green mice はEGFP遺伝子を実質的に全ての細胞型において発現しているので、EGFPの蛍光を指標に当該マウス由来の細胞を追跡することが可能である。

また、幾つかの試験においてはICRバックグラウンドのP53欠損マウス (Oncogene, vol. 8, p3313-3322, 1993) の新生仔から、精巣細胞が採集された。

精巣細胞はコラゲナーゼ (タイプIV、シグマ社製) およびトリプシン (インビトロゲン社製) を用いた2段階酵素分解によって採集された。

20 即ち、マウスの精巣を摘出し、PBS中で白膜を除去し、1mg/ml コラゲナーゼ (I型) を含むハanks液中、37℃にて適宜振盪しながら15分間インキュベートし、精細管をほぐした。PBSにより2回洗浄してはがれた間質の細胞を除去した後、1.4mg/ml DNaseを含む0.25%トリプシン液中で37℃にて適宜振盪しながら15分間インキュベートし、精細管をばらばらにした。PBSを加え、トリプシンを不活性化した後、ピペッティングを行って細胞浮遊液を得た。これを20～30μmのナイロンメッシュに通して未消化細胞塊を除去し、600×gで5分間遠心して精巣細胞を回収した。

精巣細胞は、ゼラチンコートされた組織培養プレートに配分された (2×10^5 細胞 / 3.8 cm^2)。精巣細胞用の培養培地は、StemPro サプリメント (Invitrogen 社製)、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、 $60 \mu\text{M}$ プトレシン、 30 nM セレン酸ナトリウム、 $6 \text{ mg}/\text{ml}$ D- (+) ーグルコース、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ビルビン酸、 $1 \mu\text{l}/\text{ml}$ DL-乳酸 (シグマ 5 社製)、 $5 \text{ mg}/\text{ml}$ ウシアルブミン (ICN バイオメディカル社製)、 2 mM L-グルタミン、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-メルカプトエタノール、MEM非必須ビタミン溶液 (Invitrogen 社製)、 10^{-4} M アスコルビン酸、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ d- ビオチン、 $30 \text{ ng}/\text{ml}$ β -エストラジオール、 $60 \text{ ng}/\text{ml}$ プロゲステロン (シグマ社製)、 $20 \text{ ng}/\text{ml}$ マウス上皮細胞成長因子 (EGF: Becton Dickinson 社製)、 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF: Becton Dickinson 社製)、 $10^3 \text{ units}/\text{ml}$ ESGRO (マウス白血病抑制因子: LIF、Invitrogen 社製)、 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 組換えラットGDNF (R&Dシステムズ社製)、 $1 (\text{v}/\text{v})$ %ウシ胎仔血清 (JRH バイオサイエンス社製) が添加 10 された StemPro-34 SFM (Invitrogen 社製) を使用した。細胞は5%の二酸化炭素を含む空気中で、 37°C で維持された。

一晩のインキュベート後に、浮遊している細胞は活発なピペッティングの後に第2培養プレートへ継代された。継代された細胞は1週間以内に増殖してプレートの底に拡がり、コロニーを形成した。

20 細胞はトリプシン処理によって分散され、5~14日間隔 (この間隔をDIVと称することがある) で、生体外の新しい培養プレート ($\times 1 \sim \times 1/2$ 希釈) へ移された。コロニーは、約10日で本来の大きさに成長し、細胞は再び継代された ($\times 1$ 希釈)。2度目あるいは3度目の継代から、細胞はマイトマイシンCで不活性化されたマウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) で維持され、2~5日毎に、培養初期は1 25 から $1/2$ 希釈、その後1から $1/4$ 希釈の新しいMEFへ継代された。更に、確立されたES細胞様コロニーは、2~5日毎に $1/4$ から $1/10$ 希釈の新しいMEFへ継代された。

ES細胞様コロニーの出現後、細胞は、最終濃度として15 (v/v) %FCS、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、 10^3 units/ml のESGRO (マウス白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor)、インビトロゲン社製) 及び10 ng/ml 組換えラットGDNF (R&Dシステムズ社製) を添加したダルベッコ改変イーグル培地にて培養された。

その後更に細胞は最終濃度として15 (v/v) %FCS、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、及び 10^3 units/ml のESGRO (マウス白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor)、インビトロゲン社製) を添加したダルベッコ改変イーグル培地にて維持された。

また、一部の試験においては、ES細胞様コロニーの出現後、細胞は最終濃度として15 (v/v) %FCS、0.05 mM 2-メルカプトエタノール、及び 10^3 units/ml のESGRO (マウス白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor)、インビトロゲン社製) を添加したダルベッコ改変イーグル培地にて培養され、維持された。(当該培養条件をES細胞培養条件という場合がある。)

新生仔精巣からEG細胞を誘導するために、同様の培地に20 ng/ml ヒトbFGF (インビトロゲン社製) を更に補充し、細胞はS14-m220 (大阪大学 仲野博士より提供) 上で培養された。

成体精巣培養のために、3~8週齢のP53欠損マウスからの 2×10^7 個の細胞が用いられ、抗CD9抗体により精原幹細胞が (Biol. Reprod., vol. 70, p70-75, 2004) に記載されたように回収され、選択された細胞がゼラチンコートプレート上に播種された (3×10^5 細胞/9.5 cm²)。GS細胞コロニーをマイクロマニピュレーションによりピックアップし、増殖のためにMEFへ移した。

ES様細胞とGS細胞とは、実体顕微鏡下でコロニーをパスツールピペット等でピックアップすることによっても分離できた。

中胚葉系列への分化のために、培養細胞はOP9フィーダー層上にて培養され、細胞の分化は既述 (Science, vol. 272, p722-724, 1996、Development, vol 125, p 1747-1757, 1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 100, p4018-4023, 2003、Blo

od, vol. 93, p1253-1263, 1999 等) の通り実施された。分化に用いられた全てのサイトカインはキリンビール株式会社より提供された。

培養細胞のインビトロにおける血球系細胞への分化誘導は、(Science, vol. 272, p722-724, 1996) の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞を OP 9 ストローマフィーダー上で培養することにより、血球系細胞への分化を誘導した。

また、一部の試験においては、(Development, vol 125, p1747-1757, 1998) の記載に従って、培養細胞から血球系細胞への分化誘導が行われた。即ち、培養細胞をメチルセルロース培地中で培養した。

培養細胞の、インビトロにおける心筋細胞への分化誘導は、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 100, p4018-4023, 2003) の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞を、SCF の存在下、OP 9 ストローマフィーダー上で培養することにより、心筋細胞への分化を誘導した。

培養細胞の、インビトロにおける脈管細胞（血管内皮細胞等）の分化誘導は、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 100, p4018-4023, 2003) の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞を OP 9 ストローマフィーダー上において培養することにより、脈管—造血前駆細胞へ分化を誘導し、5 日後に PECAM-1 陽性細胞をソートし、ソートされた細胞をさらに OP 9 ストローマフィーダー上で培養することにより、脈管細胞（血管内皮細胞等）への分化を誘導した。

脈管細胞は DiI アセチル化低密度リポタンパク質（モレキュラープローブス社製）の取込により特定された。

培養細胞の、インビトロにおける神経細胞およびグリア細胞への分化誘導は、N 2 B 2 7 培地を用い、(Nature Biotechnology, vol. 21, p183-186, 2003) の記載に従って実施された。即ち、当該培養細胞を、N 2 B 2 7 培地中、0. 1 %ゼラチンコート組織培養プラスチックプレートに $0. 5 - 1. 5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で播種した。培地は 2 日ごとに新しいものと交換した。N 2 B 2 7 は、改変 N 2

(25 g/ml インシュリン、100 g/ml アポトランスフェリン、6 ng/ml プロゲステロン、16 g/ml プトレシン、30 nM セレン酸ナトリウム及び 50 g/ml ウシ血清アルブミンフラクション V (Gibco 社製)) を添加

したDMEM/F12 (Sigma 社製) とB27を添加したNeurobasal 培地 (共に Gibco 社製) との1:1の混合液である。

また、ES細胞としては、129svj マウス由来のものを用いた。

一部の試験においては、CAGプロモーターの下でEGFP遺伝子をユビキタス
5 に発現しているD3 ES細胞 (大阪大学岡部博士より提供: Gene, vol. 108, p193-200, 1991) が用いられた。ES細胞は標準的なES細胞培地で維持された。

(抗体及び染色)

本発明の製造方法で製造された細胞等の性質を確認するために、自体公知のES
細胞や精子形成細胞等のマーカーの発現を調べるフローサイトメトリーが実施され
10 た。

一次抗体としては、ラット抗EpCAM(G8.8)、マウス抗SSEA-1(MC-480)、マウス抗
筋繊維タンパク質(sarcomeric protein) (MF20) (発生研究ハイブリドーマバンク、
アイオワ大学)、ラット抗マウスフォルスマン(Forssman)抗原(M1/87)、ラット抗ヒ
ト α 6-インテグリン(CD49f) (GoH3)、ビオチン化ハムスター抗ラット β 1インテグ
15 リン(CD29) (Ha2/5)、ビオチン化ラット抗マウスCD9 (KMC8)、APC結合ラット抗
マウスc-kit(CD117) (2B8)、ラット抗マウスCD31 (MEC13.3)、PE結合ラット抗
マウスTer119 (Ter-119)、ビオチン化ラット抗マウスMac1 (M1/70)、ビオ
チン化ラット抗マウスGr1 (RB6-8C5)、ラット抗マウスVE-カドヘリン(11D4.1)、
APC結合ラット抗マウスCD45 (30-F11) (BDバイオサイエンス社製)、ラッ
20 ト抗TDA抗原(EE2) (大阪大学西宗博士より提供)、APC結合ラット抗マウスF
1k-1 (Avas12 α 1) (理研西川博士より提供)、ヤギ抗マウス心筋トロポニン-1
(cTn-1) (サンタクルスバイオテクノロジー社製)、マウス抗ヒトミオシン軽鎖2v
(MLC2v) (アレクシスバイオケミカルズ社製)、ウサギ抗マウス心房性ナトリウム利
尿ペプチド(atrial natriuretic peptide; ANP) (プロトスバイオテックコーポレー
25 ション社製)、マウス抗ヒトミエリン塩基性タンパク質(MBP) (Pm43)、ウサギ抗グ
リア繊維性酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein; GFAP)、ウサギ抗マウ
スタイロシンヒドロキシラーゼ(TH)、マウス抗ヒト β -チューブリンIII (TuJ) (SDL

3D10) (シグマ社製)、抗MAP 2 ウサギポリクローナル抗体、マウス抗ミオシン重鎖モノクローナル抗体 (MF 2 0) が用いられた。

APC結合ヤギ抗ラット Ig G (Cedarlane 社製)、APC結合ストレプトアビジン (BDバイオサイエンス社製)、Alexa Fluor 488 結合ヤギ抗マウス Ig G、Alexa Fluor 647 結合ヤギ抗ラット Ig M、Alexa Fluor 633 結合ヤギ抗マウス Ig M (モレキュラープローブ社製)、Cy 3 結合ロバ抗マウス Ig G、Cy 3 結合ロバ抗ウサギ Ig G、ALP若しくはパーオキシダーゼ結合ロバ抗マウス Ig G、ALP結合ロバ抗ウサギ Ig G (ジャクソンイムノリサーチ社製)、ALP結合ウサギ抗ヤギ Ig G (ベクターラボラトリーズ社製) 又はALP結合ヤギ抗ラット Ig G (ケミコン社製) が二次抗体として用いられた。

細胞染色技術は (Proc Natl Acad Sci USA, vol. 96, p5504-5509, 1999) の記載に従って実施された。細胞はFACS-Calibur システム (BDバイオサイエンス社製) で解析した。

インビトロで分化させた機能細胞の免疫細胞染色は、標準的なプロトコルを用いて実施された。即ち細胞を 4 %パラホルムアルデヒド (PBS 中) で固定し、一次抗体で処理し、抗原の局在をCy 3を結合させた二次抗体を用いて可視化した。

ALP又はDAB染色は、VECTORアルカリフォスファターゼ基質キット又はDAB基質キット (ベクターラボラトリーズ社製) を用い、製造者のプロトコルに従って、それぞれ行われた。

アルカリフォスファターゼ染色は (Nature, vol. 352, 809-811, 1991 ; Cell, vol. 44, 831-838, 1986) の記載に従って実施された。

(移植及びレシピエントの解析)

テラトーマ形成の解析においては、約 2×10^6 個の培養された細胞がKSNヌードマウス (日本SLC) の皮下に注入され、移植から 3 週間後に解析された。形成された組織は 10 %中性緩衝ホルマリンで固定され、パラフィン切片の処理がなされた。切片はヘマトキシリンおよびエオジンで染色され、顕微鏡下観察された。

精細管内への微注入のために、約 3×10^5 個の細胞が免疫抑制されたWマウス（日本S L C）レシピエントの精細管内へ輸出管を通して注入された（Biol. Reprod., vol. 68, 167-173, 2003）。

5 全ての動物実験のプロトコールは、京都大学の動物保護および使用制度委員会によって承認されたものである。

（キメラ形成及び顕微受精）

C 5 7 B L / 6 マウスの 3.5 dpc 胚盤胞の割腔 (blastocoel) 内に 10 から 15 個の Green mice 由来の培養された細胞が、ピエゾ駆動マイクロマニピュレーターを用いて注入された（Development, vol. 121, 2397-2405, 1995）。胚盤胞は 2.5dpc の
10 偽妊娠 I C R 里親マウスの卵管又は子宮に、微注入の日に戻された。約 70% の細胞が注入時に、E S 細胞注入後のキメリズムの割合や生殖系列への伝達 (germline transmission) に影響を及ぼす正倍数性核型 (euploid karyotype) を保持していた。

4 倍体胚凝集キメラが、2 細胞胚盤胞を 300 mM マンニトール溶液中で電気パルス (2500 V/cm $10 \mu\text{s}$) を適用することによって電気融合させたこと
15 を除き、Nagay らが開発した方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p8424-8428, 1993) を用いて作成された。

12.5 dpc の胎仔マウスを摘出し、UV 光下実体顕微鏡を用いて観察した。また、当該胎仔マウスは 4% パラホルムアルデヒド中で固定し、Tissue-Tek OCT compound（サクラ精機）中で凍結し、凍結切片を作成した。切片は、蛍光顕微鏡（オリンパス共焦点レーザースキャニング顕微鏡）を用いて Green mice 由来の E G F P の蛍光
20 を指標にキメリズムを解析した。対照染色としては P I を用いた。

また自然分娩により出産されたキメラマウス新生仔を、UV 光下実体顕微鏡を用いて観察した。

顕微受精は B D F 1 卵母細胞を用いて既述の通り行われた（Development, vol. 12
25 1, p2397-2405, 1995）。胚は培養の翌日に移入された。

（R T - P C R）

R T - P C R による O c t - 4、H P R T、R e x - 1、N a n o g、E R a s、E s g - 1、C r i p t o 及び Z F P 5 7 の発現の解析は、（Science, vol. 297, 3

92-395, 2002; Mol. Cell. Biol., vol.13, 473-486, 1993; Cell, vol.113, 631-642, 2003; PNAS, vol.100, 14926-14931, 2003; Nature, vol.423, 541-545, 2003; Genome Res., vol.12, 1921-1928, 2002; Dev. Biol., vol.235, 12-32, 2001; Dev. Biol., vol.265, 491-501, 2004 等) に記載の特異的プライマーを用いて実施
 5 された。Oct-4、UTF1 及びHPRTのPCR増幅は下記の特異的プライマーを用いて行われた。

[Oct-4]

5' -AGCTGCTGAAGCAGAAGAGG-3' (配列番号 1)

5' -GGTTCTCATTGTTGTCGGCT-3' (配列番号 2)

10 [UTF1]

5' -GATGTCCCGGTGACTACGTCT-3' (配列番号 3)

5' -TCGGGGAGGATTCTGAAGGTAT-3' (配列番号 4)

[HPRT]

5' -GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3' (配列番号 5)

15 5' -CACAGGACTAGAACACCTGC-3' (配列番号 6)

(インプリントされた遺伝子の解析)

インプリントされた遺伝子のDMRの亜硫酸染色体シーケンシングは既述の通りに行われた (Development, vol.129, p1807-1817, 2002)。亜硫酸処理された染色体DNAからの各々のDMR領域のPCR増幅は、下記の特異的プライマーを用
 20 いて行われた。

[H19]

5' -GGAATATTTGTGTTTTTGGAGGG-3' (配列番号 7)

5' -AATTTGGGTTGGAGATGAAAATATTG-3' (配列番号 8)

[Me3IG]

25 5' -GGTTTGGTATATATGGATGTATTGTAATATAGG-3' (配列番号 9)

5' -ATAAAACACCAAATCTATACCAAAATATACC-3' (配列番号 10)

[Rasgrf1]

5' -GTGTAGAATATGGGGTTGTTTATATTG-3' (配列番号 11)

5' -ATAATACAACAACAACAATAACAATC-3' (配列番号 1 2)

[I g f 2 r]

5' -TTAGTGGGGTATTTTTATTTGTATGG-3' (配列番号 1 3)

5' -AAATATCCTAAAAATACAACTACACAA-3' (配列番号 1 4)

5 [P e g 1 0]

5' -GTAAAGTGATTGGTTTTGTATTTTAAGTG-3' (配列番号 1 5)

5' -TTAATTACTCTCCTACAACCTTCCAAATT-3' (配列番号 1 6)

[O c t - 4]

5' -GGTTTTTTAGAGGATGGTTGAGTG-3' (配列番号 1 7)

10 5' -TCCAACCCTACTAACCCATCACC-3' (配列番号 1 8)

DNA配列は両方向において決定された。COBRAについては、PCR産物は起源となる未転換DNA中のCpGを含む配列を認識する制限酵素により消化された (Nucl. Acid. Res., vol. 25, 2532-2534, 1997)。消化されたDNAバンドの強度は、ImageGauge ソフトウェア (フジ写真フィルム社製) により定量された。

15

結果

新生仔のDBA/2マウス又はddyマウスの精巣をGDNF、bFGF、EGFおよびLIFを含有する培養液中で培養した際に、コロニーの大部分は、細胞間架橋 (intercellular bridge) と桑実胚 (morula) 様構造により特徴付けられる、GS細胞の典型的な外観を有していた (図 1 d)。しかしながら、少数 (< 5%) のコロニーはES細胞への著しい類似を呈していた (図 1 a 及び b)。これらのコロニーはより硬く詰め込まれ (packed)、通常培養開始後 3 から 6 週間 (約 4 ~ 7 回継代) 以内に出現した。

これらのES細胞様コロニーは、FCS、2-メルカプトエタノール、マウス白血病阻害因子 (LIF)、及びグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用いて、マウス胎仔繊維芽細胞フィーダー上にて培養すると、数の増加により選択的に増殖した。2 から 3 回の継代後、培養中のほとんどのコロニーはES細胞様コロニーとなった (図 1 c)。これらのES細胞様コ

25

ロニーはE S細胞培養条件（FCS、2-メルカプトエタノール及びマウス白血病阻害因子（LIF）を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用いて、マウス胎仔繊維芽細胞フィーダー上にて培養）にて維持することが可能であった。この後、細胞をE S細胞培養条件下で維持する限りは、形態は変化しなかった。反対にG S細胞は、
5 精原幹細胞の自己再生分裂のための必須の成長因子であるGDNF（Science, vol. 287, p1489-1493, 2000）の不在のため、該条件下では増殖することが出来なかった。

ヘキスト33258を添加したキナクリン染色による染色体解析(cytogenetic analysis)は、E S様細胞が、分裂中期スプレッド(metaphase spread)の70～85%
10 において正常な核型(karyotype)（40、XY）を有することを示した（図2）。

当該E S様細胞は、インビトロで、30乃至48回の継代で5ヶ月以上、未分化状態を維持しながら増殖した。これらの結果は再現性があった。なぜなら、異なる染色体型（ddY、DBA/2、ICR等）や齢（0から8日齢）のマウスを含む
21回の実験中4回において同様な細胞が獲得されたからである。

15 E S様細胞を形成する全頻度は約 1.5×10^7 個細胞中1個であった（新生仔精巣35個に相当）。意義深いことに、少なくとも20回の試験において、新生仔精巣細胞を直接E S細胞培養条件で培養しても、G S細胞、E S様細胞のいずれも出現しなかった。同様に、少なくとも15回の試験において、新生仔精巣細胞を膜結合スチール因子（mSCF）、LIF及びbFGFの存在（EG細胞培養条件）下
20 で培養しても、G S細胞、E S様細胞のいずれも出現しなかった；GDNFの添加がG S細胞及びE S様細胞コロニーの両方の発生に必須であった。

G S細胞がE S様細胞に転換し得るか決定するために、培養開始から2ヶ月後に、マイクロマニピュレーションにより全部で148個のG S細胞コロニーをピックアップした。G S細胞は96穴プレートに移され、更に3ヶ月増殖された。その結果、
25 1個のG S細胞コロニーがE S様細胞を産生した。該E S様細胞の多能性はヌードマウス内への皮下注入による、インビボにおけるテラトーマ形成能力により確認された。

更に、本発明者らはP53ノックアウトマウス（Oncogene, vol. 8, p3313-3322, 1

993) を用いた。P53ノックアウトマウスは高い頻度で精巣テラトーマを発症する (APMIS, vol. 111, p184-191, 2003)。本発明者らはES様細胞がテラトーマ形成細胞と密接に関与し得るとの仮説を立て、当該系統からの確立されたGS細胞がより容易にES様細胞に転換するか検討した。GS細胞がICRバックグラウンドの新生P53ノックアウトマウスから確立された。GS細胞の増殖スピード及び形態は野生型細胞のそれらと区別がつかず、GS細胞を得るためにGDNFが同様に必要であった。

培養から2ヵ月後、30～40個の未分化形態のGS細胞コロニーがマイクロマニピュレーションによりピックアップされ、96穴プレートに移され、GS細胞培養液 (GDNF、LIF、bFGF、EGF含有) 中で培養された。意義深いことに、2つの異なる試験において、2ヶ月以内にGS細胞由来培養物中にES様細胞が出現し、該コロニーは野生型細胞からのES様コロニーと形態学的に区別できなかった。

P53ノックアウトGS細胞からのES様細胞の出現頻度 (2回の試験中2回) は野生型GS細胞を用いた場合と比較して極めて高かった。

P53ノックアウトマウスを用い、本発明者らは成熟精巣からのGS細胞がES様細胞を産生できるかについても試験した。精原幹細胞が抗CD9抗体を用いて3～8週齢マウスから採集され、GS細胞培地中で培養された。GS細胞は2乃至3の試験において発生した。培養開始から4～7日後に未分化形態のGS細胞がピックアップされ、インビトロでマイトマイシンC不活化されたマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) 上にてコロニーが増殖された。全体で、8回の試験中2回において、培養4週以内にES様細胞が出現した。

これらのES様細胞の表現型を調べるために、Green miceからの培養を確立した。当該miceはEGFP (enhanced green fluorescent protein) を、精原細胞を含めてユビキタスに発現しているので (Biol. Reprod., vol. 69, p612-616, 2003)、UV光励起により培養細胞をフィーダー細胞から識別することができる。

上記培養細胞中のEGFP陽性の細胞 (ES様細胞) について表面抗原の発現がフローサイトメーターにより解析され、当該細胞がほぼ一つの形質学的集団を構成することが示された (図3)。図3 (a) ～ (h) に示されるように、当該細胞は、

- SSEA-1 (ES細胞マーカー) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, p5565-5569, 1978)、 β 1-及び α 6-インテグリン (ES及びGS細胞マーカー) (Biol. Reprod., vol. 69, p612-616, 2003)、EpCAM (ES細胞及び精原細胞(spermatogonia)マーカー) (J. Reprod. Fertil., vol. 116, p379-384, 1999)およびCD9 (ES細胞及び精原幹細胞 (GS細胞) マーカー) (Biol. Reprod., vol. 70, p70-75, 2004) が陽性であり、EE2 (精原細胞マーカー) (Mol. Reprod. Dev., vol. 40, p221-227, 1995) は陽性又は弱陽性、フォルスマン抗原 (ES細胞マーカー) (Nature, vol. 292, p154-156, 1981) 及びc-kit (分化した精原細胞マーカー) (Endocrinology, vol. 140, p5894-5900, 1999) が弱陽性であった。
- 10 これとは対照に、GS細胞はSSEA-1及びフォルスマン抗原が完全に陰性であることから(図4(a)、(f))、当該ES様細胞はGS細胞とは異なる表現型を有することが示唆された。また、GS細胞は β 1-及び α 6-インテグリン、EpCAM、CD9、EE2及びc-kitが陽性であった。(図4(b)~(e)、(g)、(h))。P53ノックアウトマウスからのGS細胞は同様の発現プロファイルを示した(データ示さず)。
- 15 また、ES細胞はSSEA-1、 β 1-及び α 6-インテグリン、EpCAM、CD9、フォルスマン抗原及びc-kitが陽性であり、EE2は弱陽性であった(図5(a)~(h))。
- 培養開始前の精巣細胞は、SSEA-1が陰性であり、40%程度の集団がフォルスマン抗原陽性であった(図6(a)(b)、図7)。培養開始前の新生精巣細胞集団においてフォルスマン抗原の幾つかの発現を見出したが、それは非生殖細胞集団による発現であって、EE2陽性細胞は見出せなかった(図8)。
- 20 当該ES様細胞は、ES細胞に特徴的であるアルカリフォスファターゼが強陽性であった(図9(a))。一方GS細胞はアルカリフォスファターゼが弱陽性乃至陰性であり(図9(b))、当該ES様細胞はGS細胞とは異なる表現型を有することが示唆された。ES細胞はアルカリフォスファターゼが陽性であった(図9(c))。
- 25

次に、本発明者らは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)を用いて、胚性カルシノーマ (embryonal carcinoma: EC) 又はES細胞に特異的に発現している多くの分子を試験した。未分化なES細胞を維持するのに必須なOct-4、Rex-1及びNanogに加え (Stem Cells, vol. 19, p271-278, 2001、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 100, p14926-14931, 2003、Cell, vol. 113, p631-642, 2003、Cell, vol. 113, p643-655, 2003)、ES様細胞はCrip1、Eras、UTF1及びZFP57をES細胞と同様のレベルで発現していた (Dev. Biol., vol. 235, 12-32, 2001; Nature, vol. 423, 541-545, 2003; EMBO J., vol. 17, p2019-2032, 1998; Genome Res., vol. 12, 1921-1928, 2002; Dev. Biol., vol. 265, 491-501, 2004)。これらの結果は、当該ES様細胞は、ES細胞と表現型が類似していることを示唆した。一方、GS細胞もこれらの分子の幾つかを発現するが、発現は一般により弱かった。重要なことに、GS細胞においてはNanogの発現がほとんど認められず、GS細胞はES細胞とは異なる自己再生のメカニズムを有し、また当該ES様細胞はGS細胞とは異なる表現型を有することが示唆された (図10、11)。

ES様細胞のインプリンティングパターンを解析するために、3つの父性インプリント領域 (H19、Me3IG及びRasgrf1領域) 及び2つの母性インプリント領域 (Igf2r及びPeg10領域) の示差的メチル化領域 (differentially methylated regions: DMRs) が2つの独立した細胞について亜硫酸シークエンシングにより試験された (図12)。父性インプリント領域は異なる程度でメチル化されていたが、母性インプリント領域はES様細胞においてはほとんどメチル化されていなかった。ES細胞におけるDMRは、母性インプリント領域も含めて、一般的にES様細胞におけるものよりも、よりメチル化されており、H19領域のDMRは他の領域のDMRよりも、より広範囲にわたってメチル化されていた。逆に、GS細胞は完全に雄性的インプリンティングパターン (H19及びMe3IG DMRの完全なメチル化、並びにIgf2r DMRの脱メチル化) を示した。

次に、本発明者らはP53ノックアウトマウスからのGS又はES様細胞のインプリント状態を試験した。GS細胞のES様細胞への転換の間の4つの異なる時点での

同じ細胞集団から、染色体DNAが単離された。この試験において、DMRのインプリント状態は結合亜硫酸制限解析 (combined bisulfite restriction analysis: COBRA) (Nucl. Acid. Res., vol.25, p2532-2534, 1997) により決定された (図13A)。
野生型GS細胞の解析から推測されるように、P53ノックアウトマウスからのGS細胞は雄性インプリントパターンを有していた。しかしながら、H19、Meg3IG及びRasgf1領域のDMRにおけるメチル化の消失、及びIgf2r領域中のDMRのメチル化が、ES様細胞出現後すぐに観察された。インプリントパターンの混乱はGS細胞が消失した時にさえ継続し、ES様細胞の出現18日後において、Peg10領域のDMRのみがそのままであった。ES細胞及びES様細胞におけるOct-4領域のDMRは全て低メチル化 (hypomethylated) されており、これはこれらの細胞の未分化状態を確認した (J. Biol. Chem., vol.279, p17063-17069, 2004) (図13B)。

ES様細胞が体細胞系列へ分化することが出来るかを決定するために、本願発明者らはインビトロでES細胞の分化を誘導するためにデザインされた方法を用いた。Green mice由来のES様細胞は第一にOP9ストローマフィーダー層に移された。OP9ストローマフィーダー細胞は造血系細胞、血球細胞や筋細胞等の中胚葉系細胞の分化を支持できる (Science, vol.265, p1098-1101, 1994; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.100, p4018-4023, 2003)。10日以内に、造血系細胞、血球系細胞、脈管細胞 (血管内皮細胞等) (CD31陽性細胞) 及び自発的に拍動する心筋細胞 (MF20陽性細胞) を含む多様な細胞が確認された。血球系細胞には、赤芽球 (Ter119陽性細胞)、血球細胞 (CD45陽性細胞)、ミエロイド系細胞 (ミエロイド前駆細胞、単球系細胞 (Mac1陽性細胞)、好中球系細胞 (Gr1陽性細胞)) が含まれていた (図14A-H、図15)。

ES様細胞をメチルセルロース中で培養し、エンブリオイドボディを形成させたと
きにも、造血を誘導することが出来た (図14I)。神経系細胞の分化のために、ES様細胞をゼラチンコートディッシュ上へ移すと (Nat. Biotech., vol.21, p183-186, 2003)、該細胞はニューロン (MAP2陽性細胞) 又はグリア細胞 (MBP陽性細胞) を形成した (図14J-L)。ドパミン作動性ニューロンも、低い頻度なが

ら見出された (図 1 4M)。E S細胞を用いて分化効率を比較すると、E S様細胞は E S細胞よりもよりグリア細胞を産生し、E S様細胞から有意によりの多く脈管細胞 (血管内皮細胞等) または心筋細胞コロニーが派生した。しかしながら、E S様細胞は、E S細胞分化のためのプロトコルを用いて期待される全ての系列を産生することが出来た (表 1)。

表 1

細胞型	造血*†			脈管形成*‡		神経織発生 §		
	細胞数の 増加 (倍)	顆粒球 ／マク ロファ ージ (%)	赤血球 ¶ (%)	脈管 ¶	心臓 ¶	ニュー ロン ¶	アストロ サイト ¶	オリゴデ ンドロサ イト ¶
ES 様	116.7	7.6	19.9	111.5	8.0	126.7	34.6	4.6
	15.4	0.2	0.7	12.0	4.5	14.4	4.4	2.5
ES 細胞	102.3	7.6	24.7	49.0	3.8	162.2	10.5	0.2
	11.6	0.4	0.9	9.2	2.0	14.5	3.3	0.1

表 1 は精巢からの E S様細胞のインビトロ分化を示す。表中の値は平均値±S E Mを示す。少なくとも 3 試験からの結果である。E S細胞は 1 2 9 マウスからの由来であり、一方、E S様細胞は D B A / 2 マウスからの由来である。* : F 1 k - 1 陽性細胞 (5×10^3) が共培養 4 日後にソートされ、2 4 穴プレート中の O P 9 フィーダー上へ再び播かれた。† : 細胞はソーティング 7 日後に回収され、フローサイトメトリーにより解析された。赤血球、マクロファージ及び顆粒球が、それぞれ抗 T e r 1 1 9、抗 M a c 1 及び抗 G r 1 抗体により確認された。‡ : ソーティング 8 日後における、それぞれのウェル中の陽性細胞の数を示す。脈管細胞は D i I - アセチル化低比重リポタンパク質の取り込みにより決定された。心筋コロニーは、拍動しているコロニーを数えることにより確認された。§ : 4 8 穴プレート中のゼラチン上に細胞 (2.5×10^4) が播かれ、1 c m²あたりの陽性細胞の数が、播腫後 5 日

(ニューロン) 又は7日 (アストロサイト又はオリゴデンドロサイト) に決定された。ニューロンは抗Tu j 抗体により、一方アストロサイト及びオリゴデンドロサイトは、それぞれ、抗GFAP抗体又は抗MBP抗体により決定された。ドパミン作動性ニューロンが〜10細胞/ウェル産生された。¶ : t-テストにより統計学的に有意($P < 0.05$)であることを示す。

ES様細胞は、ヌードマウス内への皮下注入により、インビボにおいてテラトーマを形成する能力について更に試験された。移植後3乃至4週間で、全てのレシピエント(8/8)において、移植された細胞は典型的なテラトーマを生じた(図14N)。当該癌(テラトーマ)には、3つの胚葉(embryonic germ layer)の派生物、例えば神経、表皮、筋肉、気管支上皮、軟骨、骨、扁平上皮細胞、神経上皮等が含まれていた。同様の結果が、3つの異なるクローンやP53ノックアウトマウスからのES様細胞(8/8)を用いて得られ、ES細胞に由来するテラトーマとの有意な組織学的差異は観察されなかった。これとは対照に、GS細胞や新鮮な精巣細胞をヌードマウスの皮下へ移植しても、癌形成は認められなかった(データ示さず)。従って、当該ES様細胞は、ES細胞と類似した様式で、多様な体細胞系列へ分化する特性を有することが示された。

当該ES様細胞は精巣からの起源であるので、生殖系列細胞への分化能力は、精原細胞移植の技術により試験された(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.91, p11298-11302, 1994; 特表平7-501705号公報)。この方法は、精原幹細胞により、不妊動物の空の精細管を再コロニー化(recolonize)させて、成熟精子へ分化させる。当該培養細胞を免疫抑制された未成熟のWマウス内に移植した(Biol. Reprod., vol.68, p167-173, 2003)。このマウスは先天的に不妊であって、精細管内に内在性の分化している生殖細胞を有していない(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.91, p11298-11302, 1994)。移植後1ヶ月で、全てのレシピエント動物(10/10)は精巣内にテラトーマを発生した。精細管組織は乱れており、組織学的解析では精子形成の兆候はなかった。テラトーマ内に認められた細胞の型は、皮下注入により発生させたものと同様であり(データ示さず)、このことは精細管の微小環境は当該培養細胞の分化パターンに影響しないことを示している。これとは対照に、野生型又はP53ノックアウト

トのGS細胞が精細管内に注入されたときには、移植後2ヶ月以内に正常な精子形成が認められた(図14O-Q)。

更に当該ES様細胞のインビボにおける分化特性を調べるために、当該ES様細胞を胚盤胞内に微注入した。なぜなら、ES細胞は胚盤胞へ入り(colonize)、生殖系列を含む、体内の全ての細胞型に寄与するからである。5から15個のGreen mice由来のES様細胞をC57BL/6の胚盤胞内に注入した。キメリズムや生殖系列伝達の割合に極めて影響を及ぼす正倍数性細胞(euploid cell)の割合は、注入時には70%であった(Transgenic Res., vol.6, p321-328, 1997)。

インビトロで24時間培養後、当該キメラ胚は偽妊娠レシピエントマウスの子宮に戻された。レシピエント動物の幾つかはキメリズムをみるために12.5 dpcで解析され、他のレシピエントは最後まで発生させた。胎生12.5日において胎仔は正常に発生し、25%(3/12)においてキメリズムが観察され、胎仔の全身においてUV光下でEGFPの発現が認められた(図16A)。キメラマウス胎仔は自然分娩により出産され、新生動物では36%(13/36)において胎仔と同様にキメリズムが観察された(図16B)(図17)。キメリズムは成熟期の被毛色によっても確認された(図16C)。EGFP発現を示す6匹の死んだ胎仔を認め、幾つかの胚は部分的に又は完全に墮胎されていた。ドナー細胞の寄与のパターンは解析された両方の段階(胎仔及び新生仔)において類似していた;EGFP陽性ドナー細胞の寄与が中枢神経系(脳、脊髄、神経管等)、肝臓、心臓、肺、精巣、体節(somites)、腸管、及び卵黄嚢(yolk sac)、胎盤の絨毛膜(chorionic membrane)を含む他の組織において認められた(図16D-J)(図18)。

ドナー細胞は6週齢におけるキメラマウスの精巣内においても見出されたので、子孫を獲得するために顕微受精を行った。円形の精子が回収され、C57BL/6×DBA/2(BDF1)卵母細胞中へ微注入された。81個の培養された胚のうち、64個(79%)が2細胞へ分化し、5匹の偽妊娠雌内へ移入された。18個(22%)の胚が着床し、レシピエントマウスからの2匹の子孫のうち1匹がドナー起源を表すEGFP蛍光を示した(図16K)。興味深いことに、対照ES細胞は胚への幅広い寄与を示したが、GS細胞を用いた試験においてはドナー細胞の寄与は観察されな

かった (表 2)。

表 2

細胞の型	移入され た胚の数	レシピエ ントの数	生まれた 仔の数*	生存して いる仔の 数†	キメラ (%)	
					雄	雌
E S 様	193	11	54	36	9/22 (41)	4/14 (29)
E S	91	14	14	4	2/2 (100)	2/2 (100)
G S	124	7	28	16	0/8 (0)	0/8 (0)
4n 救出 E S 様	92	4	0	NA	NA	NA
4n 救出 E S	30	2	0	NA	NA	NA

表 2 は E S 様細胞の胚発生への寄与を示す。NA : 不実施を示す。* : 幾つかの
5 試験では、胎仔は 19.5 d p c にて帝王切開により分娩された。† : 出生後翌日
において生存している仔の数を示す。

E S 陽細胞の全発生能を試験するために、本発明者らは 4 倍体補足技術 (tetraploid
d complementation technique) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p8424-8428
, 1993) を用いた。この技術は、全てドナー E S 細胞からなる生存動物の産生を可能
10 にする。全部で 92 個の 4 倍体胚が電気融合により創造され、E S 様細胞と凝集され、
偽妊娠 I C R 雌へ移入された。レシピエント動物の幾つかは 10.5 d p c にて屠
殺され、1 匹の正常に見える胎仔と正常な胎盤による多くの吸収が認められた。胎仔
はいくつかの成長遅延を示したものの、卵黄嚢を含む全身に渡り E G F P 遺伝子を明
確に発現していた (図 16 L)。このことは、胎仔はドナー E S 様細胞に由来するこ
15 とを示す。

以上より、インビボにおいても本発明の E S 様細胞は生殖系列を含む生体のあら
ゆる体細胞に分化しうる能力 (全能性) を有することが示された。

(考察)

上記実施例は、出生後の精巣の中に多能性の幹細胞の存在を明らかとした。「幹細胞可塑性」現象の幾つかのケースは細胞融合が原因であるが (Cell, vol. 116, p639-648, 2004)、本発明のES様細胞は同じメカニズムによっては説明できない。なぜなら、本発明のES様細胞は皮下移植後にテラトーマを形成するからである。

- 5 精巣由来のES様細胞は、ES/EG細胞の出生後の相対物(counterpart)でありうる。上記実施例の結果は予期できないものである。なぜなら、PGCは13.5 dpc後に試験的テラトーマ形成又はEG細胞形成に対して抵抗性になるからである (Cell Differ., vol. 15, p69-74, 1984; Development, vol. 120, p3197-3204, 1994)。EG細胞は初期の生殖細胞からの多能性幹細胞の単離物の例でしかないと考えられる (Nature, vol. 359, p550-551, 1992; Cell, vol. 70, p841-847, 1992)。
- 10 EG細胞は8.5-12.5 dpc胎仔から回収された初期の生殖細胞に由来し、mSCF、LIF及びbFGFの混合物を用いてインビトロで培養される。しかしながら、細胞をインビボでテラトーマ形成させた後に培養するケースを除けば、多能性細胞は同じ培養条件を用いても、新生の生殖細胞から単離することはできない
- 15 (Development, vol. 120, p3197-3204, 1994)。本発明のES様細胞は2つの理由によりテラトーマ由来ではなさそうである。第一に、本発明に係るES様細胞の派生物の頻度は自然に起こるテラトーマ形成の極めて低い頻度よりも有意に高い (129ハイブリッドバックグラウンドの雄11292匹中、1つのテラトーマ (J. Natl. Cancer. Inst., vol. 27, p443-453, 1961))。第二に、増殖因子の補充がES
- 20 様細胞の確立に必須である。実際に、自然に起こったテラトカルシノーマから少数のEC細胞株しか獲得されていない (Experimental approaches to mammalian embryonic development, Cambridge University Press, p475-508, 1986)。従って、多能性細胞を形成する能力は生殖系列に内在し得る。上記実施例に基づき、本発明のES様細胞を、生殖系列にのみ分化できるGS細胞と識別するために、多能性生殖
- 25 系列幹細胞 (multipotent germline stem cells: mGS細胞) と呼ぶことを提案する。

本発明において、提案される一つの重要な問題は、mGS細胞の起源である。一つの可能性は、mGS細胞はGS細胞から独立して出現し、胎仔期から精巣中に存

在していた未分化の多能性細胞の集団を起源とすることである。EG細胞は12.5 d p c までのPGCから樹立されたが (Cell, vol. 70, p841-847, 1992; Development, vol. 120, p3197-3204, 1994) 、類似の特徴を有する細胞が新生精巢中に残存し、ES様細胞を産生したのかもしれない。実際に、野生型mGS細胞のインプリンティング解析の結果はmGS細胞のための異なる起源を示唆する。雄性的生殖細胞においては、染色体インプリンティングは胎仔期に消去され、雄特異的インプリンティングが出生時あたりに前精原細胞において獲得されはじめ、出生後に完了する (Genomics, vol. 58, p18-28, 1999; Hum. Mol. Genet., vol. 9, p2885-2894, 2000; Genes Dev., vol. 6, p705-714, 1992) 。GS細胞は典型的な雄性インプリンティングパターンを有しており、mGS細胞のインプリンティングパターンは雄性的生殖細胞や体細胞とは明らかに異なっていた。これはmGS細胞が、インプリント消去を受けた雄性的生殖細胞を部分的に起源とし得ることを示唆する。

新生仔精巢中の雄性生殖細胞(gonocyte)は異成分性(heterogenous)であると報告されている；偽足性(pseudopod)雄性生殖細胞は精原細胞移植の後に精子形成を生ずる能力を有す一方、円形(round)雄性生殖細胞は精子形成を生じず、インビトロでアポトーシスを起こす。精原幹細胞活性に関してmGS細胞はGS細胞とは異なっているため、mGS及びGS細胞は異なった雄性生殖細胞の型を起源としているかもしれない。

もう一方の可能性は、mGS細胞は精原幹細胞に由来し、多能性細胞になれる能力は生殖系列細胞(精原幹細胞等)の一般的な特徴の1つであるかもしれないということである。セルトリ細胞との相互作用は、通常は生殖細胞を精子形成に向かわせ、精巢内における多系列分化を抑制し得る。しかしながら、本発明の培養条件中で、セルトリ細胞の不在下で生殖系列細胞を継続的に刺激して増殖させたときに、生殖細胞がこの抑制から開放され、細胞のうちのいくつかが多能性細胞に転換するのかもしれない。テラトジェネシス(teratogenesis)は環境の影響に対して感受性が強く、インビボにおいて胎仔生殖堤(fetal genital ridge)の子宮外(ectopic)移植によりテラトーマ形成は有意に高められる(～10倍) (Cell Dev., vol. 15, p69-74, 1984) 。本発明の多能性幹細胞の製造方法において、培養開始後の早い時点

における継代による体細胞の希釈が、mG S細胞の樹立に有効であることから、精巣の環境は多系列分化にとって抑制的であるようである。PGCはインビトロ培養後にのみ多能性となることができ、サイトカイン補充がEG細胞転換にも必要であるので (Cell, vol. 70, p841-847, 1992; Nature, vol. 359, p550-551, 1992) 、増殖刺激及び体細胞からの解放が生殖系列細胞の分化プログラムを変更したのかもしれない。

上記実施例中の証拠の多くが、精原幹細胞の多能的特性のための支持を提供している。第一に、新生精巣中にはPGC様生殖細胞は見出されず、EG細胞培養条件 (mSCF + LIF + bFGF) 中では新生精巣からmG S細胞を誘導することは出来なかった。従って、mG S細胞はEG細胞とは異なるメカニズムを経て発生し、該結果は新生精巣中のPGC様細胞は、たとえ存在するとしても、mG S細胞の創造の原因ではないことを示唆している。

第二に、野生型及びP 5 3 ノックアウトマウス由来のG S細胞コロニーをピックアップしたものからmG S細胞が出現したという結果は、mG S細胞はG S細胞から発生することを意味する。P 5 3 遺伝子の欠失により精巣テラトーマ形成に対する感受性が100倍も増加する (APMIS, vol. 111, p184-191, 2003) 。それにもかかわらず、この系統からのG S細胞は形質学的には野生型精原細胞と類似しており、精細管中に移入したときに正常にみえる精子形成を産生する。この意味で、P 5 3 ノックアウトマウスからのG S細胞は野生型G S細胞と区別がつかず、精原幹細胞のための規準を満たす。このモデルを用いて、G S細胞における雄性インプリントの喪失に伴い、mG S細胞に部分的雄性インプリントが起こることを見出した。野生型G S細胞においても同様であると考えられる；部分的な雄性インプリントパターンはmG S細胞の起源を直接示すものではなく、むしろES / EG細胞において報告されているように (Development, vol. 120, p3197-3204, 1994; Development, vol. 125, p2273-2282, 1998; Science, vol. 293, p95-97, 2001) インビトロにおけるエピジェネティックな不安定性を示しているのかもしれない。

これらの結果は、G S細胞が多能性である、或いは一つの遺伝子 (P 5 3) の欠失によってより容易に多能性を獲得し得ることを強く示唆する。マウスにおけるテ

ラトーマ形成は、もっぱら 129/Sv バックグラウンドにおいて発生し、PGC から発生すると考えられている (Cell Differ., vol.15, p69-74, 1984)。しかしながら、上記実施例は精原幹細胞が多能性であることを強く示唆する。

興味深いことに、mGS 細胞における多能性の獲得は精原幹細胞潜在力の喪失と

5 同時に起こる。精巣起源であるにもかかわらず、mGS 細胞は精細管中に戻して移入されたときに、テラトーマを形成することは、精細管の環境はもはや細胞が多能性となった後では生殖細胞分化 (精子形成) を支持できないことを示している。これは、長期間培養後に正常な精子形成を生ずることができる GS 細胞とは対照的である (Biol. Reprod., vol.69, p612-616, 2003)。従って、mGS 細胞は ES/E

10 G 細胞と細胞機能に関してより密接に関連している。精原幹細胞潜在力の喪失の理由は不明である；しかしながら、これは mGS 細胞の樹立過程の間における GDNF に対する反応性の喪失と関連しているかもしれないと推測される。なぜなら GDNF はインビボにおいて精原幹細胞の自己更新 (self-renewing) 分裂を促進するための必須因子であるからである (Science, vol.278, p1489-1493, 2000)。

15 上記実施例において最も重要な結果の一つは、mGS 細胞の正常胚発生への寄与である。ドナー細胞マーカーが生殖系列細胞を含む生体の多様な部分に存在した。

これらの結果は、mGS 細胞は癌を産生するのみならず、正常胚発生にも寄与し得ることを実証する。mGS 細胞のインプリント状態は生殖系列能力には影響を及ぼさず、キメラ動物から正常な子孫が獲得された。これは、ES 細胞および EG 細胞

20 の両方が、たとえ雄性インプリントパターンを伴っていても生殖系列キメラを産生するとの以前の報告と一致する (Experimental approaches to mammalian embryonic development, Cambridge University Press, p475-508, 1986; Development, vol.120, p3197-3204, 1994; Dev. Biol., vol.161, p626-628, 1994; Curr.Biol., vol.7, p881-884, 1997)。

25 出生後の精巣からの多能性幹細胞の派生は、医学及びバイオテクノロジーにおける重要な実用価値を有する。本発明の製造方法により製造された mGS 細胞は、他に報告された出生後動物から得られた多能性細胞とは、形態学、マーカーの発現、および分化能力の点から異なっている (Trends Cell Biol., vol.12, p502-508, 20

02; Cell, vol. 116, p639-648, 2004)。個々の細胞型の生物学を研究し、臨床応用の可能性を評価するのは重要であるが、mGS細胞は、ES細胞から特定の系列の細胞を引き出すための技術を直接適用できる点で重要な利点を有している。mGS細胞は出生後の動物から、動物（胎仔や胚を含む）を犠牲にすることなく獲得することができるので、mGS細胞の派生はES細胞と比較して倫理上の問題もより少ない。更に自家移植のために、組織適合性で多能的な組織を利用できることは、ES細胞を基礎とした技術に関連した免疫学的問題を回避することもできるであろう。P53ノックアウトマウス試験等の結果は、mGS細胞は成熟精巣から生じ得る事を示唆する。現研究段階においては、成熟精巣からGS細胞をより効率的に導くための系の開発が重要であり、例えばRNA干渉等により、GS細胞におけるP53発現の抑制が、mGS細胞の派生の頻度を増大させるのに有用かもしれない。また分化の範囲及び効率に対するインプリンティングの影響を試験することも重要であろう。

出生後の雄性生殖細胞は精子を産生するために完全にコミットしていると考えられていたが、本発明は、その多能性を証明し、またES様幹細胞を派生する源として精巣が役立つことが示唆された。GS細胞と併せて、ここに述べた新たな幹細胞株は、生殖系列の生物学の理解に重要な関わりあいがあり、バイオテクノロジーおよび医学のための比類のないツールを提供する。

産業上の利用可能性

本発明の製造方法を用いれば、従来受精卵や胚などからのみ得ることの出来た多能性幹細胞を、出生後の個体から製造することが可能である。当該多能性幹細胞を用いれば、自家移植のための組織適合性を有する多様な組織を構築することが可能であり、再生医療、遺伝子治療等の医学分野において有用である。また、当該多能性幹細胞はトランスジェニック動物やノックアウト動物等の作成に用いることができるので、バイオテクノロジー分野において有用である。

本出願は日本で出願された特願2004-101320（出願日：2004年3月30日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

5 配列表フリーテキスト

配列番号1 : Oct-4の特異的プライマー

配列番号2 : Oct-4の特異的プライマー

配列番号3 : UTF1の特異的プライマー

配列番号4 : UTF1の特異的プライマー

10 配列番号5 : HPRTの特異的プライマー

配列番号6 : HPRTの特異的プライマー

配列番号7 : H19の特異的プライマー

配列番号8 : H19の特異的プライマー

配列番号9 : Meg3 IGの特異的プライマー

15 配列番号10 : Meg3 IGの特異的プライマー

配列番号11 : Rasgrf1の特異的プライマー

配列番号12 : Rasgrf1の特異的プライマー

配列番号13 : Igf2rの特異的プライマー

配列番号14 : Igf2rの特異的プライマー

20 配列番号15 : Peg10の特異的プライマー

配列番号16 : Peg10の特異的プライマー

配列番号17 : Oct-4の特異的プライマー

配列番号18 : Oct-4の特異的プライマー

請求の範囲

1. グリア細胞由来神経栄養因子 (G D N F) 又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得ることを含む、多能性幹細胞の製造方法。
- 5 2. 培地が更に白血病抑制因子 (L I F) を含む、請求項 1 に記載の製造方法。
3. 培地が更に上皮細胞成長因子 (E G F) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (b F G F) の少なくともいずれかを含む、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。
4. 精巣細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、請求項 1 ～ 3 の
- 10 いずれか 1 項に記載の製造方法。
5. 該精巣細胞は精原幹細胞である、請求項 1 に記載の製造方法。
6. 該精原幹細胞は G S 細胞である、請求項 5 に記載の製造方法。
7. 該精巣細胞は P 5 3 不全である、請求項 1 に記載の製造方法。
8. 以下の工程を含む、請求項 1 に記載の製造方法：
- 15 (工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (G D N F) 又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、培養細胞を得る工程；
(工程 2) 白血病抑制因子 (L I F) を含む培地を用いて、工程 1 で得られた培養細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程。
9. 工程 1 の培地が更に白血病抑制因子 (L I F) を含む、請求項 8 に記載の製
- 20 造方法。
- 1 0. 工程 1 の培地が更に上皮細胞成長因子 (E G F) 及び塩基性繊維芽細胞成長因子 (b F G F) の少なくともいずれかを含む、請求項 8 又は 9 のいずれか 1 項に記載の製造方法。
- 1 1. 工程 1 が精巣細胞をフィーダー細胞の存在下で培養することを含む、請求
- 25 項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の製造方法。
- 1 2. 以下の工程を含む、請求項 1 に記載の製造方法：
(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (G D N F) 又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、G S 細胞を得る工程；

(工程2) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて、工程1で得られたGS細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程。

13. 精巣細胞が哺乳動物由来である、請求項1～12のいずれか1項に記載の製造方法。

5 14. 哺乳動物が出生後である、請求項13に記載の製造方法。

15. 多能性幹細胞がSSEA-1、フォルスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitからなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、請求項1に記載の製造方法。

10 16. 多能性幹細胞がSSEA-1、フォルスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitが陽性である、請求項15に記載の製造方法。

17. 請求項1～16のいずれか1項に記載の製造方法により製造された多能性幹細胞。

15 18. SSEA-1、フォルスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitからなる群から選ばれる少なくともいずれかが陽性である、精巣細胞に由来する多能性幹細胞。

19. SSEA-1、フォルスマン抗原、 β 1-インテグリン、 α 6-インテグリン、EPCAM、CD9、EE2及びc-kitが陽性である、請求項18に記載の多能性幹細胞。

20 20. 以下の工程を含む、キメラ胚の製造方法：

(工程1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程。

21. 以下の工程を含む、キメラ動物（ヒトを除く）の製造方法：

25 (工程1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巣細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程；

(工程 3) 当該キメラ胚を宿主動物の子宮又は卵管に移入し、キメラ動物 (ヒトを除く) を得る工程。

2 2. 以下の工程を含む、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物の製造方法：

5 (工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 当該多能性幹細胞を宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程；

(工程 3) 当該キメラ胚を宿主動物の子宮に移入し、キメラ動物 (ヒトを除く) を得る工程；

10 (工程 4) 当該キメラ動物を交配し、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物を得る工程。

2 3. 以下の工程を含む、4 倍体キメラ胚の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 該多能性幹細胞を 4 倍体胚に導入し、4 倍体キメラ胚を得る工程。

15 2 4. 以下の工程を含む、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 該多能性幹細胞を 4 倍体胚に導入し、4 倍体キメラ胚を得る工程；

20 (工程 3) 当該 4 倍体キメラ胚を宿主動物の子宮又は卵管に移入し、多能性幹細胞に由来する非ヒト動物を得る工程。

2 5. 以下の工程を含む、機能細胞の製造方法：

(工程 1) グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) 又はその均等物を含む培地を用いて精巢細胞を培養し、多能性幹細胞を得る工程；

(工程 2) 該多能性幹細胞を機能細胞分化条件にて培養し、機能細胞を得る工程。

25 2 6. 該機能細胞は中胚葉系細胞である、請求項 2 5 に記載の製造方法。

2 7. 該中胚葉系細胞が、血球系細胞、脈管系細胞および心筋細胞からなる群から選ばれるいずれかである、請求項 2 6 に記載の製造方法。

2 8. 該機能細胞は外胚葉系細胞である、請求項 2 5 に記載の製造方法。

29. 該外胚葉系細胞は神経系細胞である、請求項28に記載の製造方法。
30. 神経系細胞が、神経細胞、グリア細胞、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトからなる群から選ばれるいずれかである、請求項29に記載の方法。
31. 該機能細胞は内胚葉系細胞である、請求項25に記載の製造方法。
- 5 32. グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）又はその均等物を含む、精巢細胞に由来する多能性幹細胞の製造用組成物。
33. 更に白血病抑制因子（LIF）を含む、請求項32に記載の組成物。
34. 更に上皮細胞成長因子（EGF）及び塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）の少なくともいずれかを含む、請求項32又は33のいずれかに記載の組成物。

1/14

図 1

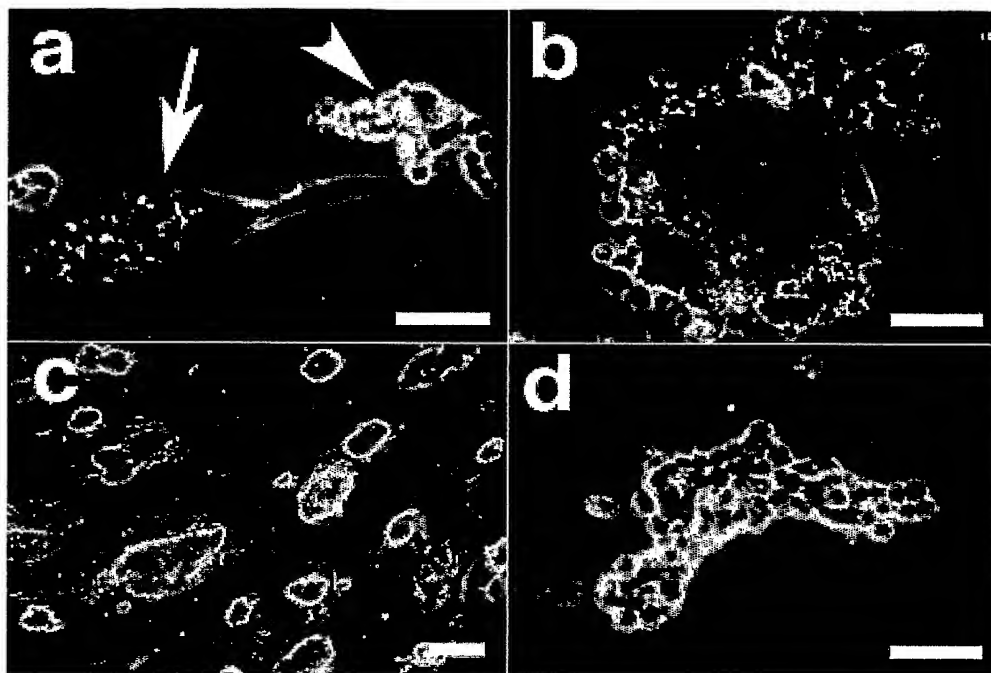
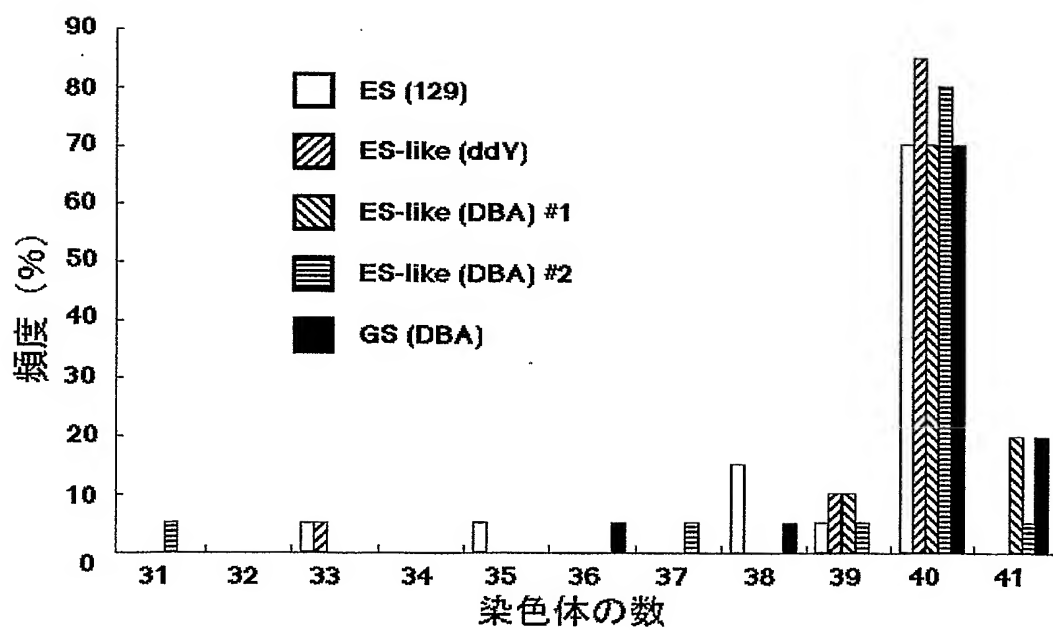


図 2



2/14

図 3

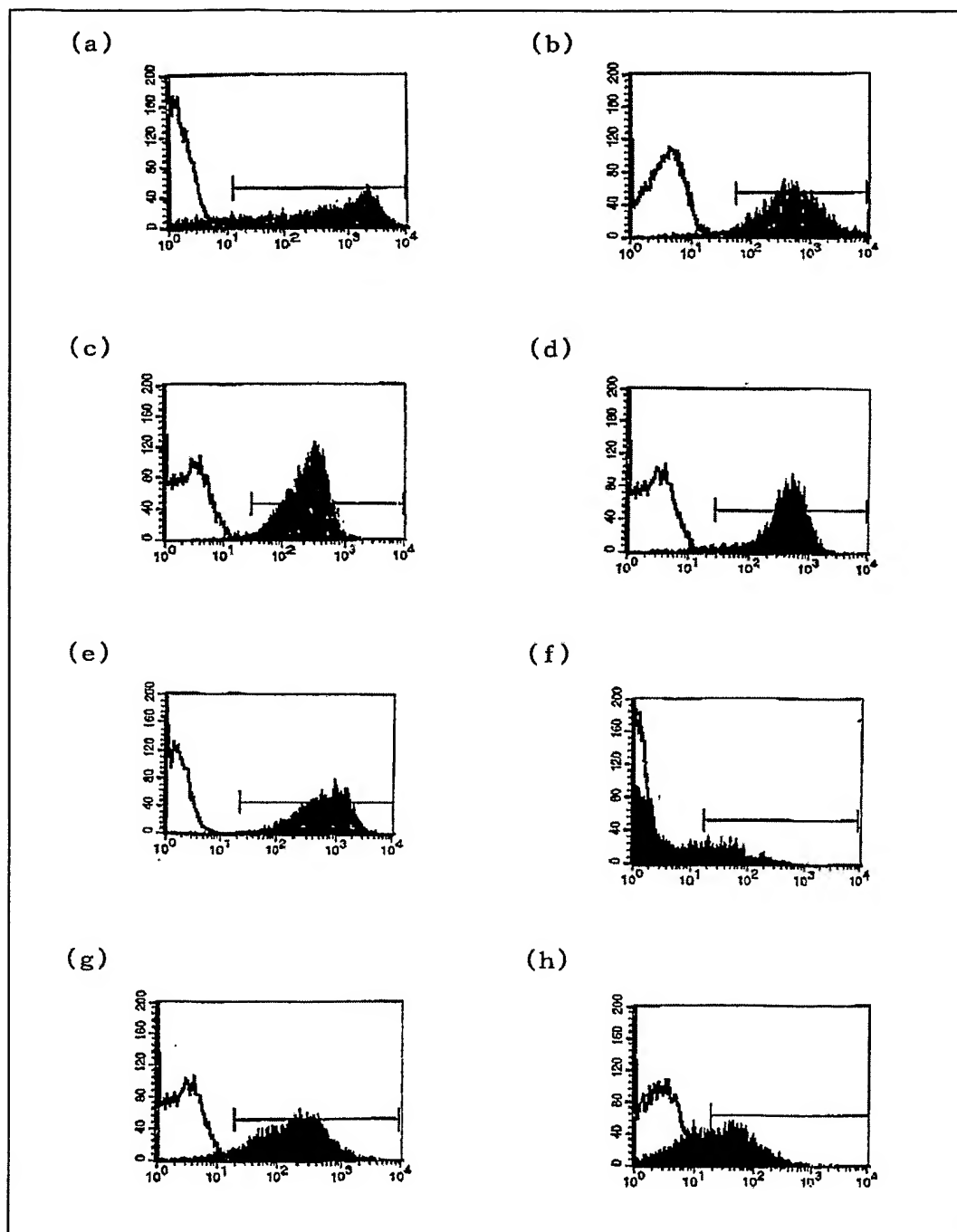


図 4

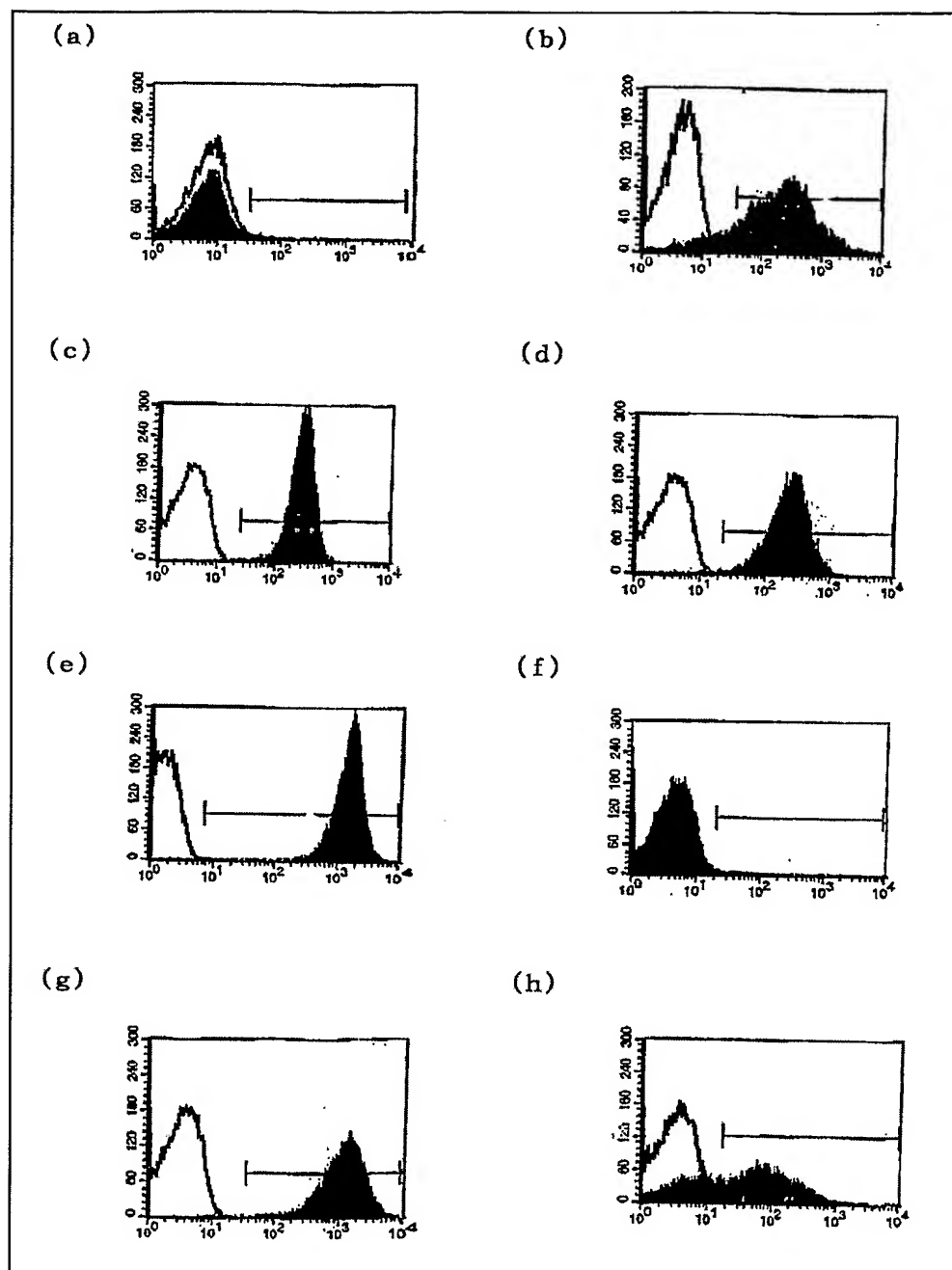
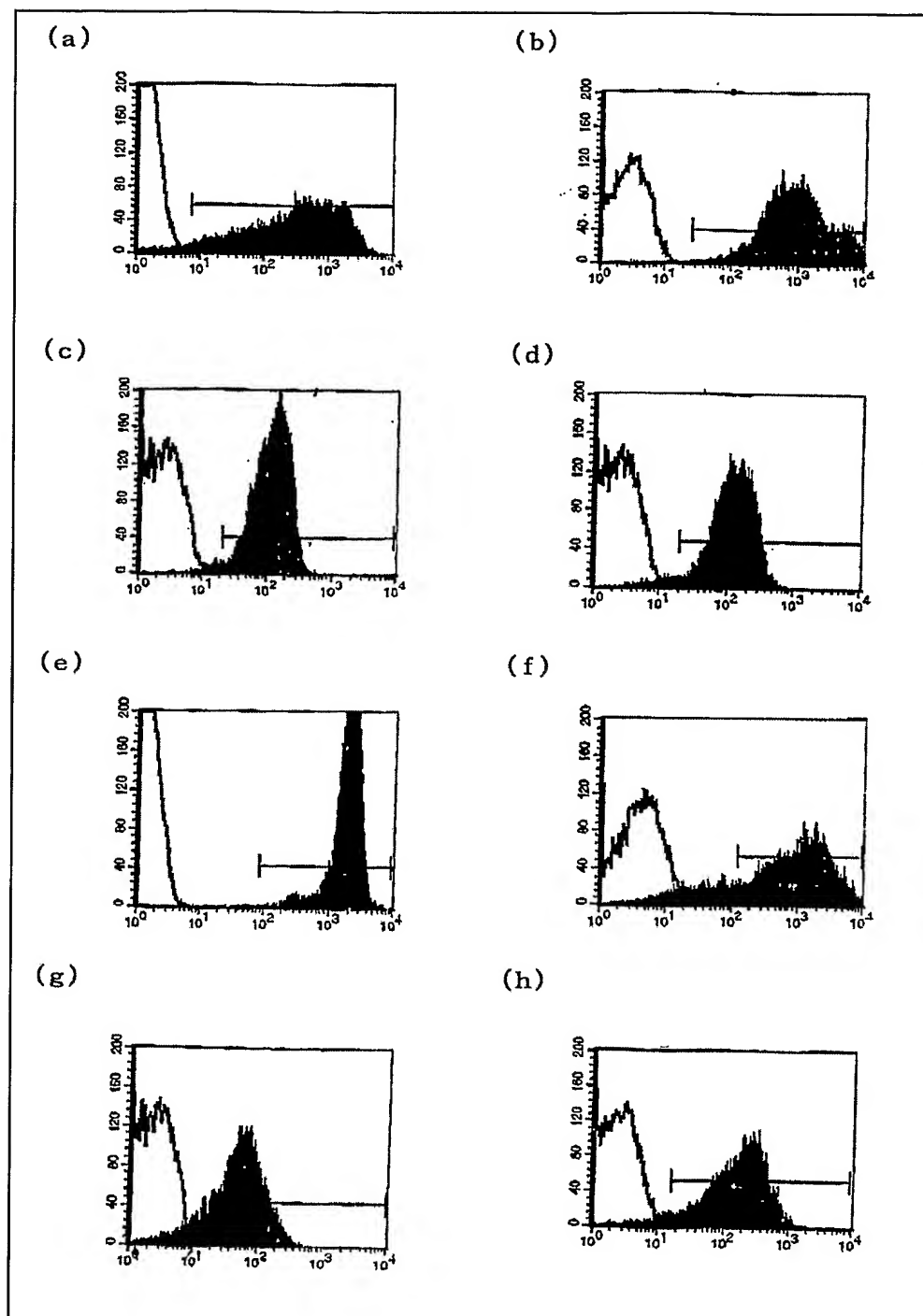


図 5



5/14

図 6

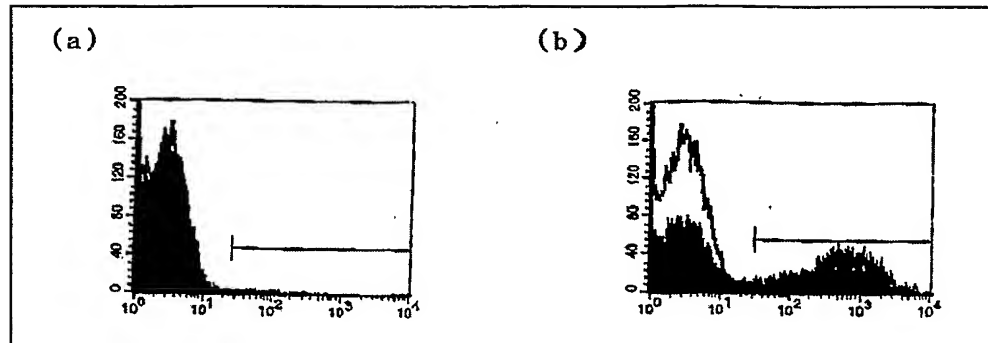
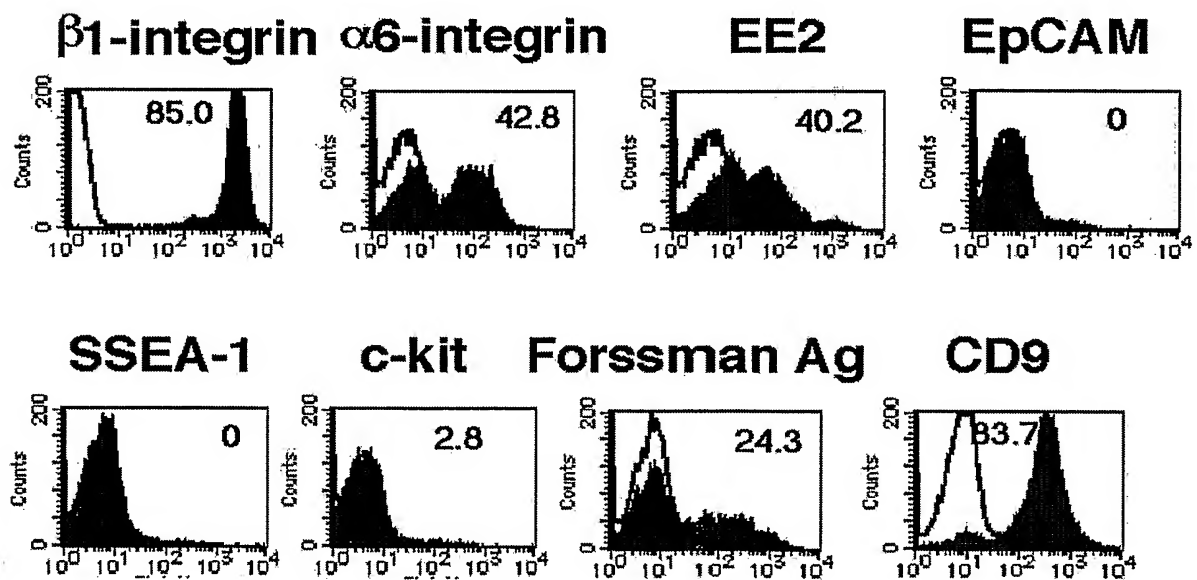


図 7



6/14

図 8

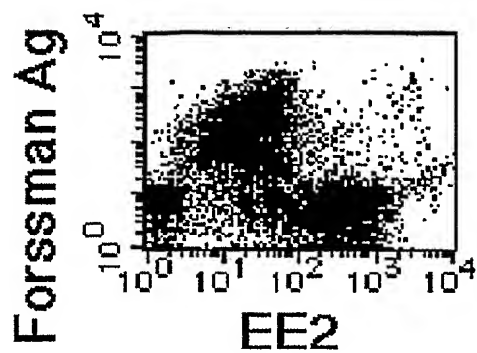
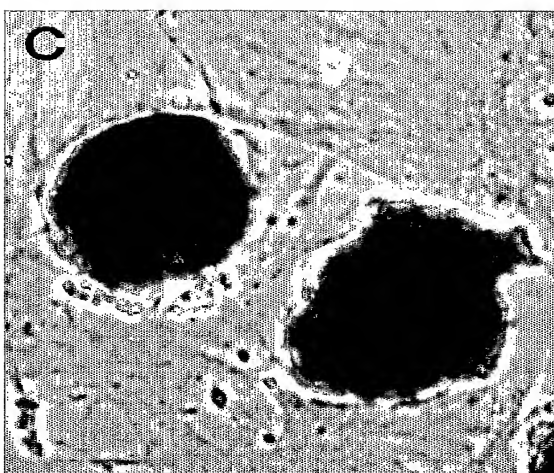
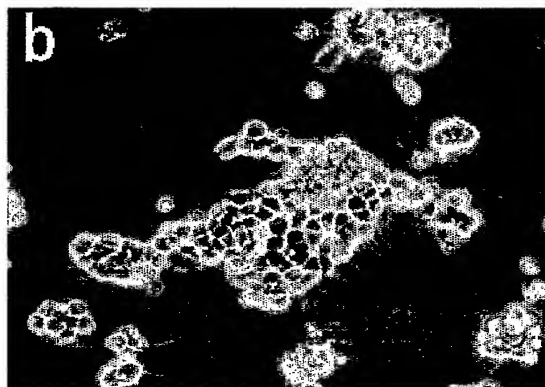
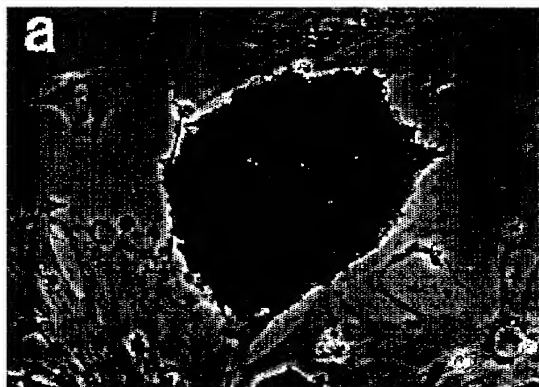
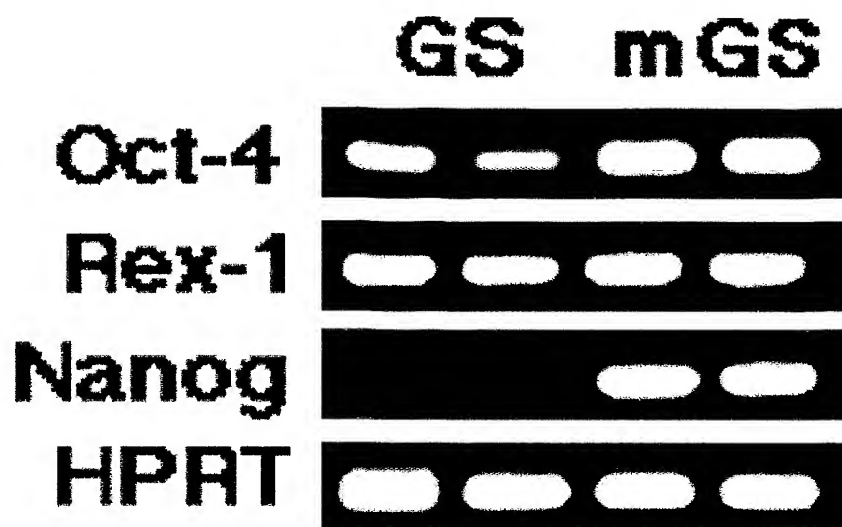


図 9



7/14

☒ 1 0



☒ 1 1

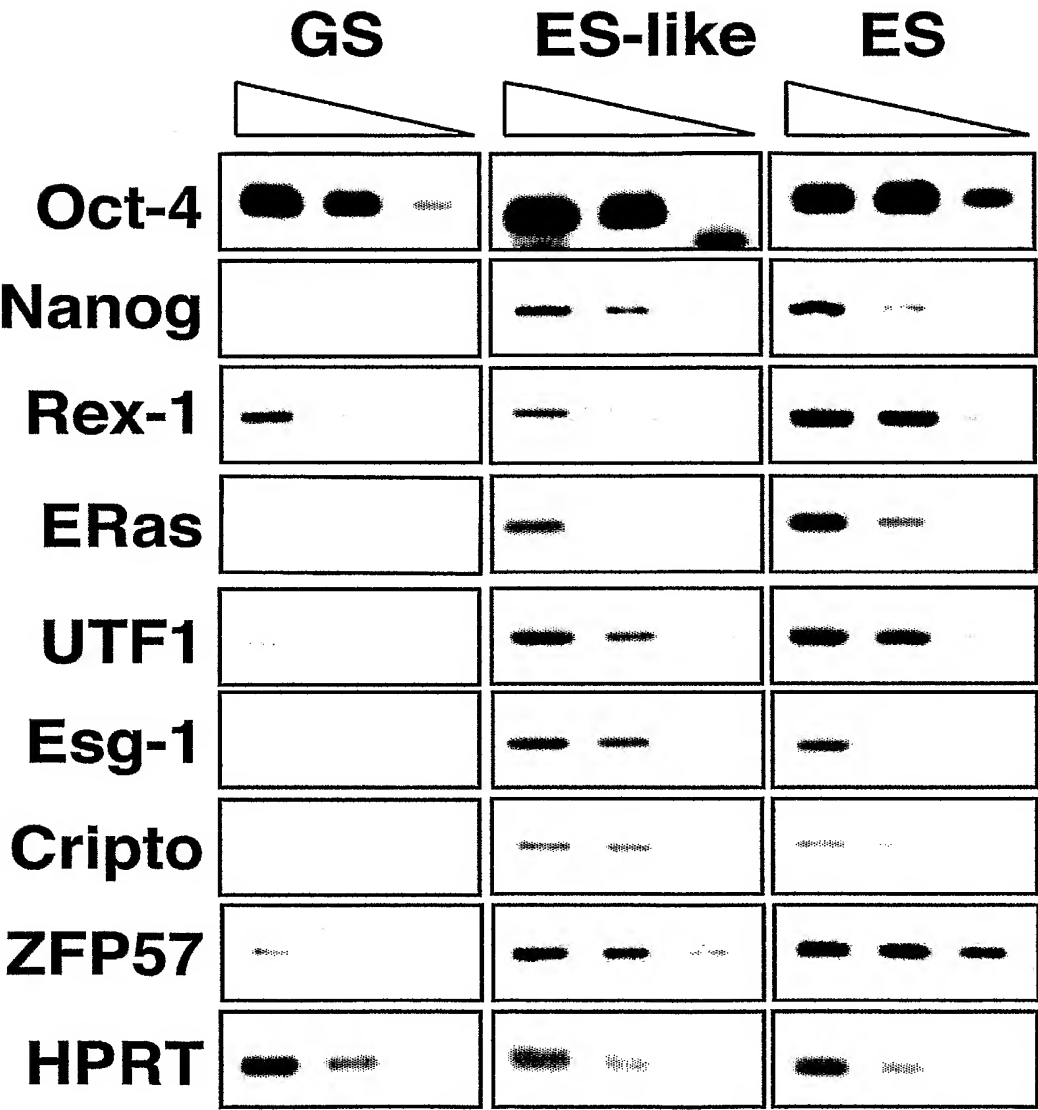


図 12

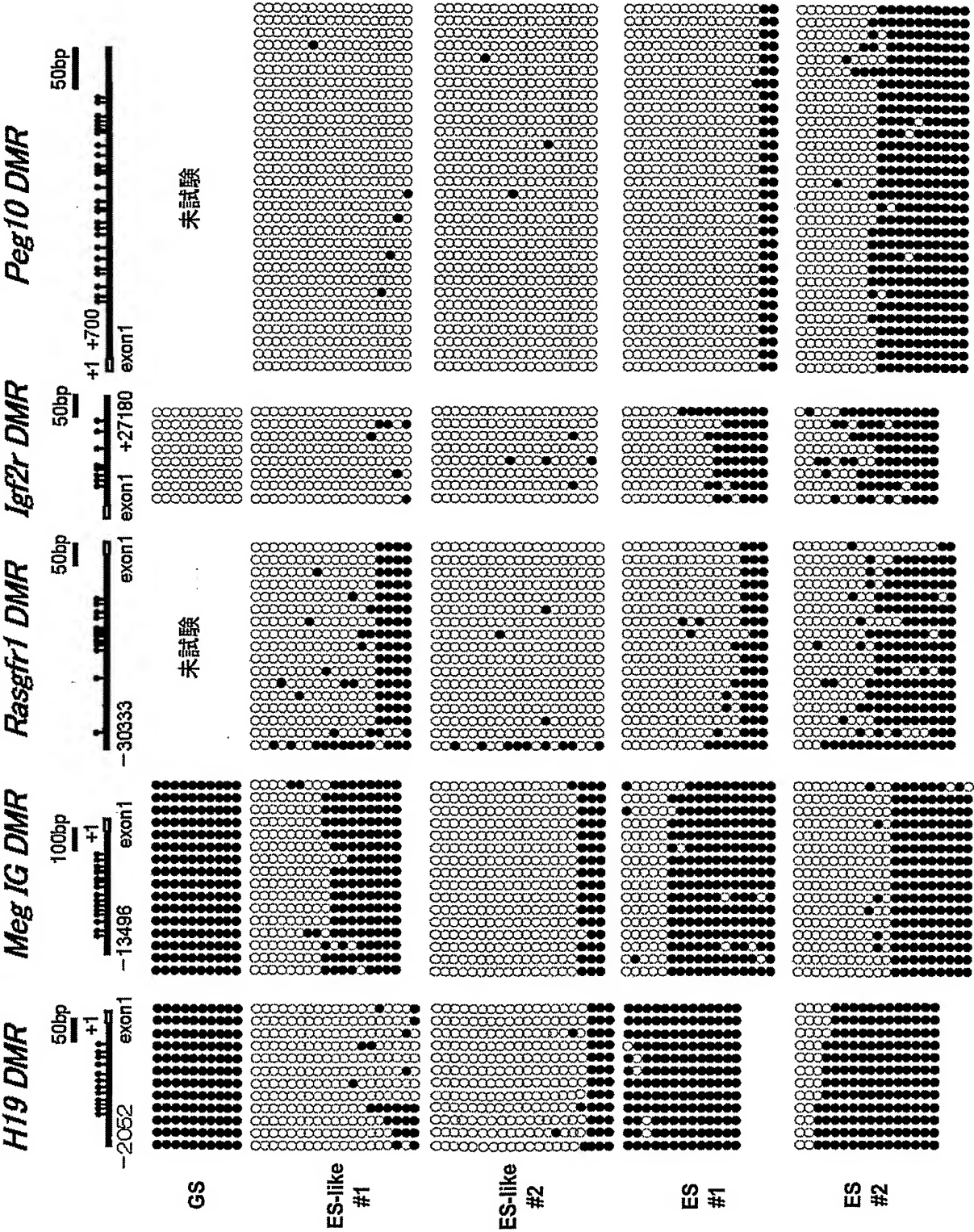


図 13

A



B

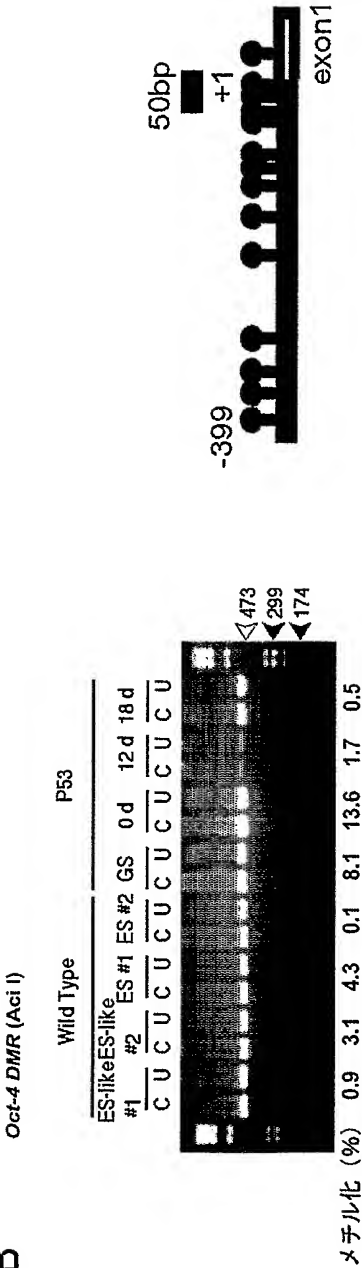
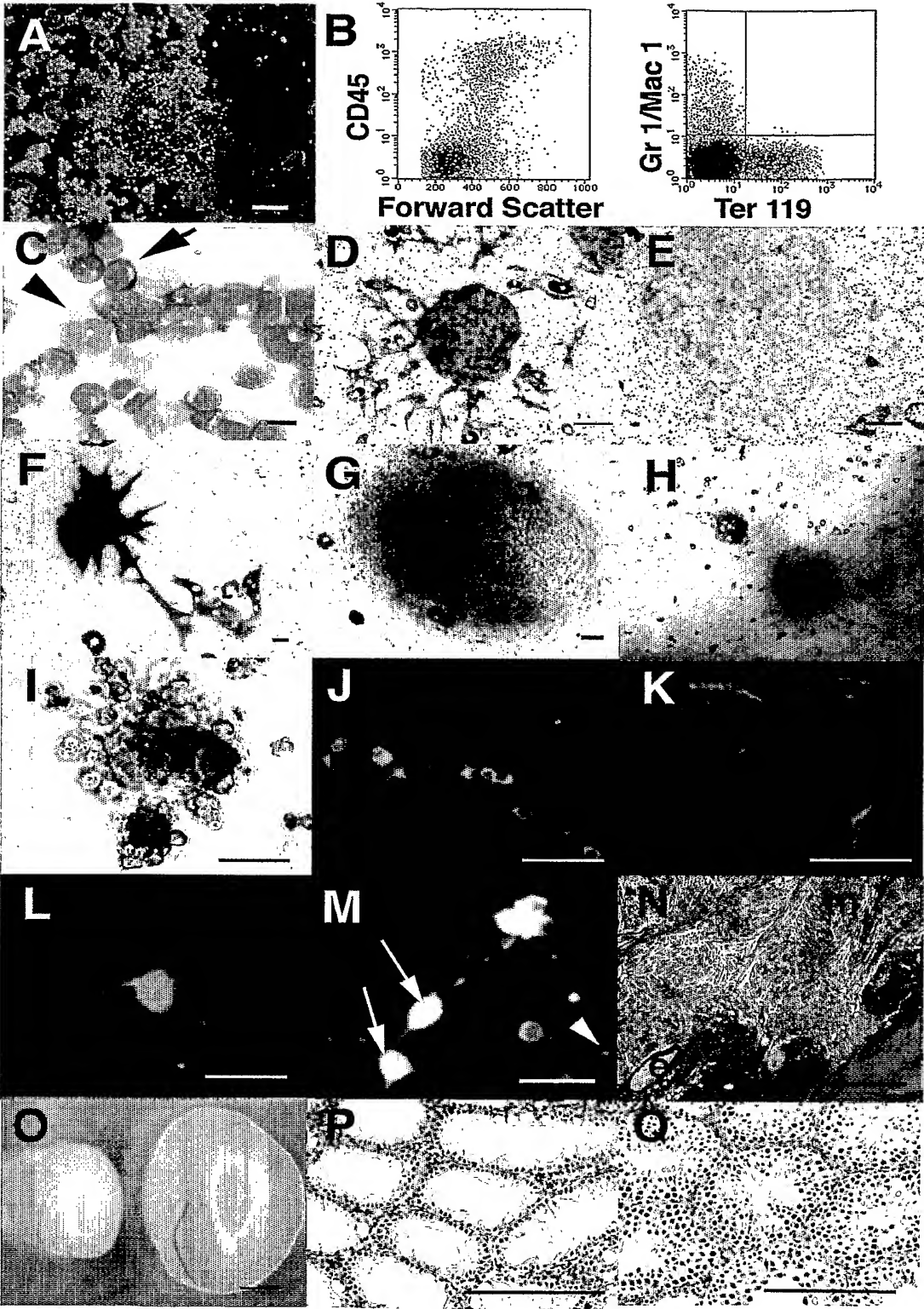


図 14



12/14

図 15

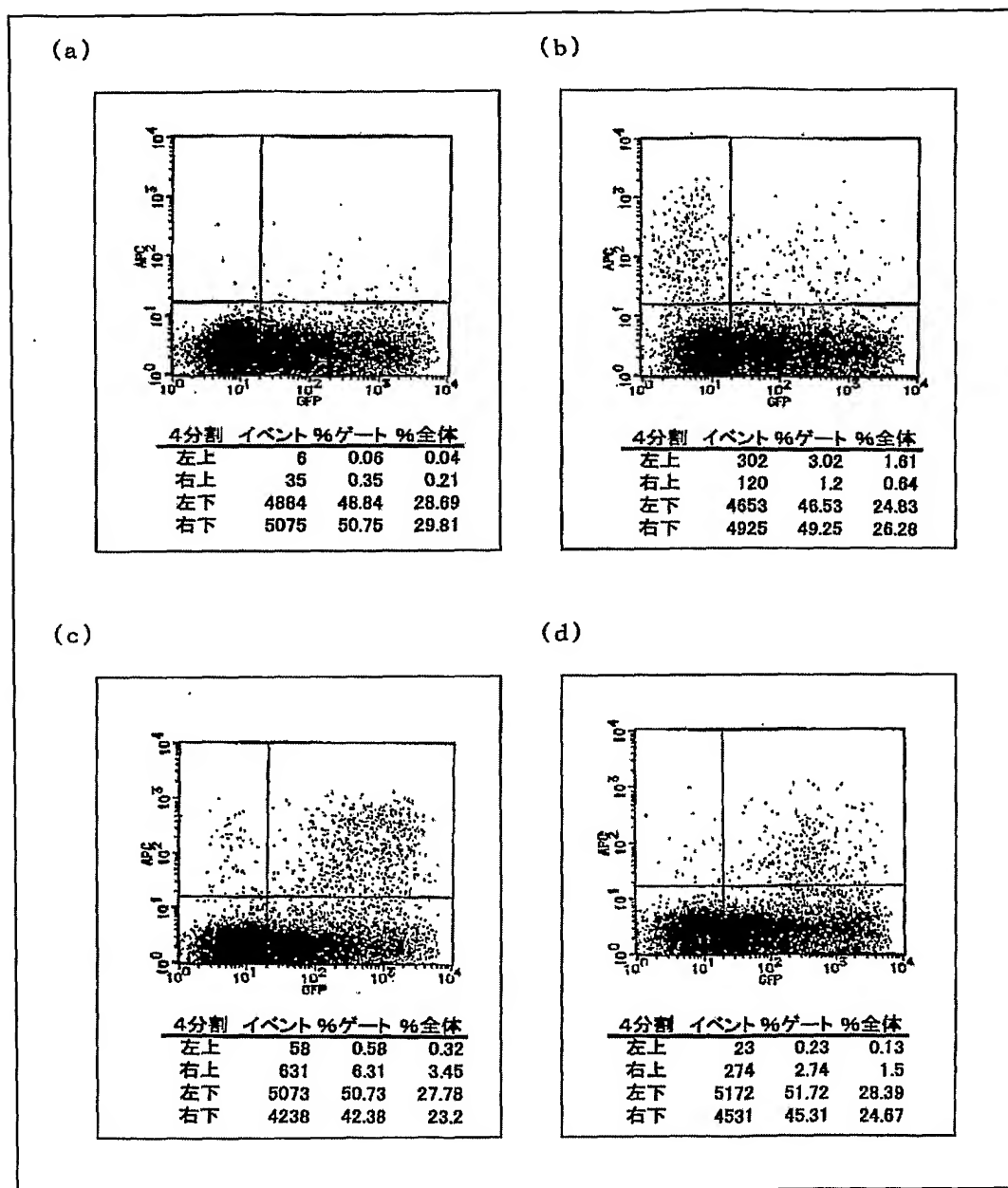


図 16

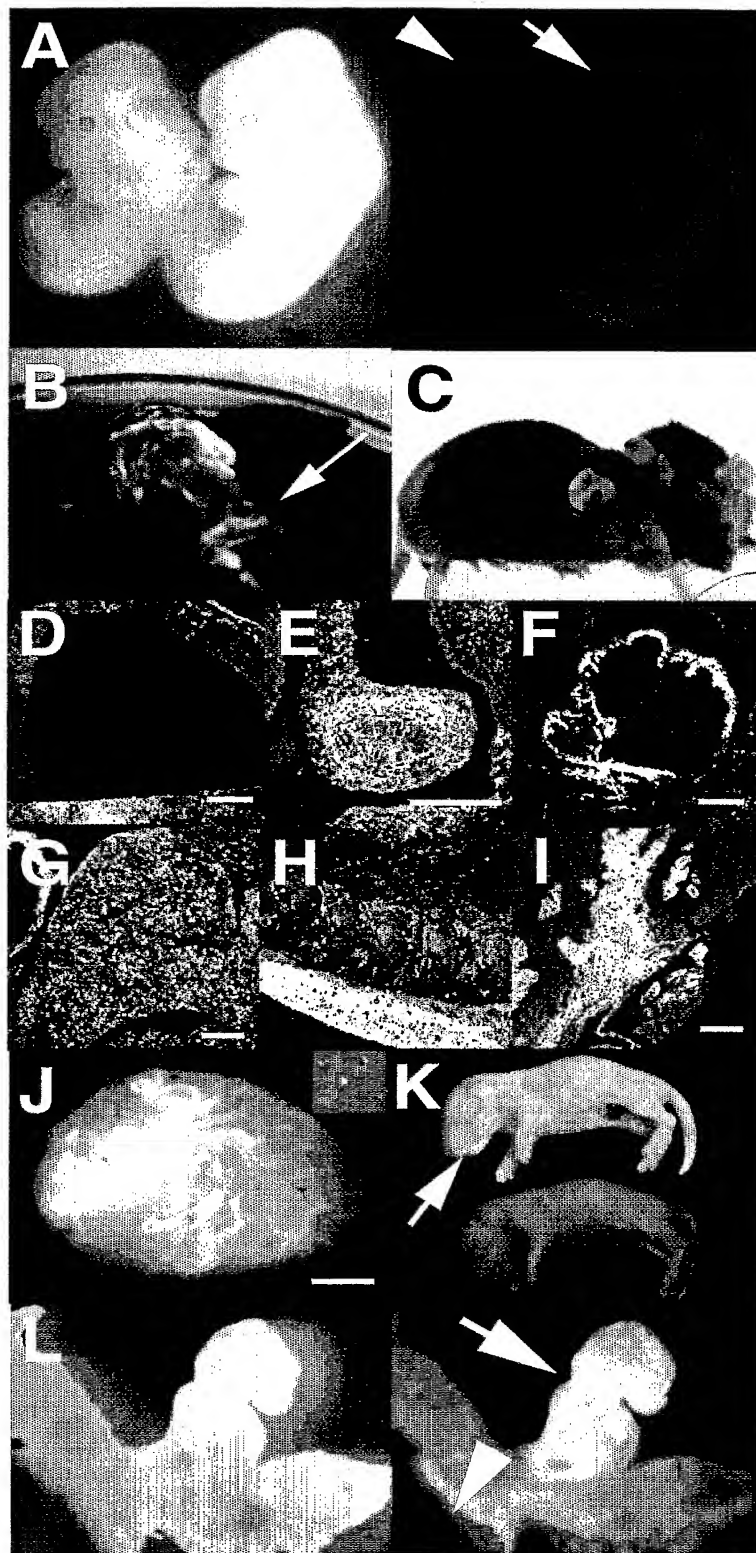


図 17



図 18



1/8

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Shirankai Kyoto University Faculty of Medicine Alumni
Association Inc.

<120> Method for producing a pluriipotent stem cell derived from testis
cells

<130> 09704

<150> JP 2004-101320

<151> 2004-03-30

<160> 18

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Oct-4

<400> 1

agctgctgaa gcagaagagg

20

2/8

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Oct-4

<400> 2

ggttctcatt gttgtcggct

20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for UTF1

<400> 3

gatgtcccg t gactacgtc t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for UTF1

<400> 4

tcggggagga ttcgaaggta t

21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for HPRT

<400> 5

gctggtgaaa aggacctct

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for HPRT

<400> 6

cacaggacta gaacacctgc

20

4/8

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for H19

<400> 7

ggaatatttg tgttttttga ggg

23

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for H19

<400> 8

aatttgggtt ggagatgaaa atattg

26

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

5/8

<223> specific primer for Meg3 IG

<400> 9

ggtttggtat atatggatgt attgtaatat agg

33

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Meg3 IG

<400> 10

ataaaacacc aaatctatac caaaatatac c

31

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Rasgrf1

<400> 11

gtgtagaata tggggttggtt ttatattg

28

6/8

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Rasgrf1

<400> 12

ataataacaac aacaacaata acaatc

26

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Igf2r

<400> 13

ttagtggggt atttttatatt gtatgg

26

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

7/8

<223> specific primer for Igf2r

<400> 14

aaatataccta aaaatacaaa ctacacaa

28

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Peg10

<400> 15

gtaaagtgat tggttttgta tttttaagt

30

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Peg10

<400> 16

ttaattactc tcctacaact ttccaaatt

29

8/8

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Oct-4

<400> 17

ggtttttttag aggatggttg agtg

24

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> specific primer for Oct-4

<400> 18

tccaacccta ctaaccatc acc

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	Mito KANATSU-SHINOHARA et al., Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal mouse Testis, 29 December, 2004 (29.12.04), Vol.119, pages 1001 to 1012	1-34
P,A	Mito KANATSU-SHINOHARA et al., CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells, Biol.Reprod., January 2004, Vol.70, No.1, pages 70 to 75	1-34
A	Yuko TADOKORO et al., Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway, Mech.Dev., April 2002, Vol.113, No.1, pages 29 to 39	1-34



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 28 January, 2005 (28.01.05)

Date of mailing of the international search report
 15 February, 2005 (15.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017125

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takashi SHINOHARA et al., Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes, Biol. Reprod., May 2002, Vol.66, No.5, pages 1491 to 1497	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017125

Claims 21, 22 and 24 pertain to essentially biological processes for production of animals and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(ii) of the Regulations under the PCT, to search. However, the present application is based on the acquisition of multipotential stem cells from testoid cells and, therefore, search was made on these claims too.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C 1 2 N 5 / 0 6

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C 1 2 N 5 / 0 6

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	Mito KANATSU-SHINOHARA et al., Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal mouse Testis, 29 December 2004, Vol.119, pages 1001-1012	1-34
P, A	Mito KANATSU-SHINOHARA et al., CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells, Biol. Reprod., Jan 2004, Vol.70, No.1, pages 70-75	1-34

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.01.2005

国際調査報告の発送日

15.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4B

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Yuko TADOKORO et al., Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway, Mech. Dev., April 2002, Vol.113, No.1, pages 29-39	1-34
A	Takashi SHINOHARA et al., Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes, Biol. Reprod., May 2002, Vol.66, No.5, pages 1491-1497	1-34

請求の範囲21, 22及び24は、動物の生産の本質的に生物学的な方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(ii)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものではあるが、出願は、精巢細胞より多能性幹細胞を得たことに基づくものであり、これらも国際調査を行う対象とした。